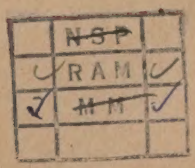
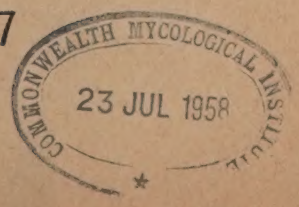
ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. VI No 2

1 9 5 7





POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW
SEKCJA MIKROBIOLOGII OGÓLNEJ, ROLNICZEJ I PRZEMYSŁOWEJ

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. VI No 2

1957
PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: Jadwiga Ziemięcka, członek-korespondent PAN — Lublin, Kazimierz Bassalik, członek rzeczywisty PAN — Warszawa, Józef Heller, członek-korespondent PAN — Warszawa, Jadwiga Jakubowska — Łódź, Adolf Joszt — Gliwice, Aniela Kozłowska — Kraków, Władysław Kunicki-Goldfinger — Wrocław, Eugeniusz Pijanowski członek-korespondent PAN — Warszawa, Feliks Przesmycki — Warszawa

KOMITET REDAKCYJNY

Redaktor naczelny — Władysław Kunicki-Goldfinger
Sekretarz Redakcji — Natalia Balicka

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

Nakład 1047 + 113 egz.	Oddano do składania 6. V. 57 r.
Ark. wyd. 9,0, druk. 6,75.	Podpisano do druku 23. VIII. 57 r.
Papier bezdrz. 80 g, 70×100.	Druk ukończono w sierpniu 1957 r.
Cena zł 25,—	Nr zam. 636/57. F-17

WROCŁAWSKA DRUKARNIA NAUKOWA

Prof. dr Adolf Joszt
1889—1957

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1957, 6, 103-105

J. Paluch i *K. Kluczycki*

PROF. DR INŻ. ADOLF JOSZT

W dniu 16 marca 1957 r. przedwcześnie odszedł od nas wybitny uczony i pedagog, profesor zwyczajny technologii chemicznej przemysłu rolnego i mykologii technicznej, kierownik Katedry Technologii Chemicznej Przemysłu Rolnego oraz Katedry Technologii Wody i Ścieków Politechniki Śląskiej w Gliwicach, a poprzednio Politechniki Lwowskiej — dr inż. Adolf Joszt.

Urodził się w dniu 17 czerwca 1889 r. we Lwowie. Mając 22 lata otrzymał dyplom inżyniera chemika i rozpoczął działalność naukową jako asystent, a następnie adiunkt Krajowej Szkoły Gorzelniczej w Dublanach. W tym okresie wykonuje doświadczalną pracę z zakresu chemii fizycznej; w r. 1913 uzyskuje stopień doktora nauk technicznych.

1916 r. wykłada zastępczo w Akademii Rolniczej w Dublanach technologię rolniczą i pełni funkcję sekretarza Akademii. W 1920 r. mając lat 31, habilituje się na Politechnice Lwowskiej na podstawie pracy doświadczalnej „O amylokoagulazie I" i uzyskuje prawo wykładania z zakresu technologii rolniczej. Od 1919 do 1923 r. zajmuje stanowisko kierownika Zakładu Technologii Rolniczej Politechniki Lwowskiej w Dublanach.

W 1923 r., mając lat 34, zostaje mianowany nadzwyczajnym profesorem technologii rolniczej na Wydziale Rolniczo-Lasowym Politechniki Lwowskiej w Dublanach, a w 1927 r. uzyskuje takie same stanowisko na Wydziale Chemicznym tejże uczelni. W 6 lat później zostaje profesorem zwyczajnym technologii chemicznej przemysłu rolnego i mykologii technicznej, pozostając na tym stanowisku do 1939 r.

W okresie wojny, do czasu okupacji niemieckiej, jest zwyczajnym profesorem Lwowskiego Instytutu Politechnicznego, a w czasie okupacji niemieckiej organizuje i kieruje średnią szkołą chemiczną, prowadząc

jednocześnie tajne nauczanie na Technicznych Kursach Fachowych we Lwowie.

Po wojnie, jak zawsze pełen energii, włącza się znów do pracy wykazując zawsze dużą inicjatywę, doświadczenie, śmiałość myśli i talent organizacyjny. Nie szczędząc swych gasnących sił współdziała przy organizowaniu Politechniki Śląskiej, a szczególnie jej Wydziału Chemicznego, na którym w marcu 1945 r. obejmuje stanowisko profesora zwyczajnego technologii chemicznej przemysłu rolnego. Kierowana przez profesora Katedra Technologii Chemicznej Przemysłu Rolnego zostaje decyzją Ministerstwa Szkolnictwa Wyższego w 1952 r. przemianowana na katedrę Technologii Wody i Ścieków, następnie przeniesiona na Wydział Inżynieryjno-Budowlany, wreszcie wcielona do nowokreowanego Wydziału Inżynierii Sanitarnej, którego prof. Joszt był jednym z twórców.

W ciągu 46 lat czynnej, niestrudzonej pracy zawodowej, a w ciągu szeregu lat pozostawania na stanowisku profesora wyższej uczelni technicznej, prof Joszt wszystkie siły poświęca pracy naukowej, dydaktycznej i organizacyjnej.

W działalności naukowej profesora dają się zauważyć dwa zasadnicze kierunki. Od 1911 r. przez 40 lat pracuje czynnie naukowo w dziedzinie zagadnień dotyczących technologii oraz mikrobiologii przemysłu fermentacyjnego, a w ostatnim dziesięcioleciu głównie w zakresie zagadnień związanych z technologią wody i ścieków oraz mikrobiologią sanitarną.

Praca naukowa profesora dotyczyła przede wszystkim zagadnień enzymatyki skrobiowej, obejmuje jednak też problemy fermentacji i karmelizacji cukrów w przemyśle gorzelniczym. Profesor interesował się również problematyką zanieczyszczeń wód powierzchniowych, uzdatniania wody do picia i dla celów przemysłowych, jak również oczyszczania i wykorzystania ścieków fabrycznych.

O wartości pracy naukowej prof. Joszta świadczą nie tylko publikacje wyników własnych prac eksperymentalnych, których posiada powyżej 30. Świadczy o niej również dorobek jego uczniów i asystentów, obejmujący powyżej 60 publikacji naukowych, w tym wiele prac doktorskich wykonanych w zakładach kierowanych przez niego. O dorobku naukowym profesora świadczy jednak przede wszystkim stworzenie szkoły polskich technologów i mikrobiologów, nie tylko w zakresie gorzelnictwa, piwowarstwa, słodownictwa i cukrownictwa, ale również w dziedzinie przemysłowej i komunalnej gospodarki wodnej. Dawni asystenci profesora zajmują poważne stanowiska w nauce jako profesorowie wielu wyższych uczelni w Polsce. Spotykamy ich też na kierowniczych stanowiskach w naczelnych władzach i instytucjach przemysłowych.

Działalność pedagogiczna prof. Joszta nie ograniczała się wyłącznie do szkolnictwa wyższego. Współpracując z naukową organizacją gorzelnictwa we Lwowie od 1927 do 1933 r. prowadził kursy dla kierowników gorzelni, wykładając na nich technologię i mikrobiologię gorzelniczą. Od 1946 do 1949 r. był naukowym kierownikiem kursów gorzelniczych w Krakowie i Czernichowie, a od 1947 do 1949 r. wykładał mikrobiologię i enzymatykę na kursach piwowarskich w Tychach. W latach 1948 — 1951 był kierownikiem naukowym placówki badawczej Międzywojewódzkiego Komitetu Ochrony Rzek przed Zanieczyszczeniem w Katowicach.

Był członkiem wielu stowarzyszeń naukowych, jak Towarzystwa Naukowego Warszawskiego, Śląskiego Towarzystwa Przyjaciół Nauk, Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów i innych. W 1956 r. został powołany na członka honorowego Polskiego Towarzystwa Chemicznego. Współpracował też przez szereg lat z Komisją Nauk Rolniczych i Leśnych oraz Nauk Technicznych Polskiej Akademii Umiejętności w Krakowie.

Podkreślić także należy działalność profesora w zakresie publicystyki. Od 1933 do 1939 r. był współredaktorem czasopisma „Przemysł Rolny", a w ostatnich latach członkiem Komitetu Redakcyjnego „Acta Microbiologica Polonica".

Od 1950 do 1955 r. był zastępcą przewodniczącego Rady Naukowej Głównego Instytutu Przemysłu Rolnego i Spożywczego w Warszawie. Do ostatniej chwili życia był członkiem Komitetu Mikrobiologicznego oraz Komitetu Gospodarki Wodnej Polskiej Akademii Nauk.

Profesor Joszt pełnił cały szereg funkcji zarówno na uczelni lwowskiej, jak i śląskiej. Był dziekanem Wydziału Rolniczo-Lasowego, a później Wydziału Chemicznego Politechniki Lwowskiej. W 1936 r. wybrany rektorem Politechniki Lwowskiej, piastował tę godność przez 2 lata. Po wojnie był dziekanem Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej oraz przez szereg lat przewodniczącym Komisji Egzaminu Dyplomowego.

Działalność wychowawczą profesora cechowało wielkie umiłowanie młodzieży. Całe swoje życie poświęcił na kształcenie inżynierów chemików, technologów i mikrobiologów przemysłu rolnego oraz inżynierów sanitarnych.

W uznaniu zasług w dziedzinie nauki, dydaktyki i wychowania został odznaczony w 1938 r. Krzyżem Komandorskim Orderu Polski Odrodzonej, w 1951 r. Złotym Krzyżem Zasługi, w 1955 r. Medalem X-lecia Polski Ludowej i wreszcie w 1957 r. Rada Państwa nadała mu pośmiertnie Order Sztandaru Pracy I Klasy.

Profesor Joszt był wybitnym, o szerokich horyzontach uczonym. Zawsze zdawał sobie sprawę z konieczności ścisłego powiązania teorii

z praktyką. Cechowała go niezłomność przekonań, śmiałość poglądów, szczera bezpośredniość oraz wielka pogoda ducha. Interesował się zarówno matematyką, jak i literaturą, historią i filozofią. Jego umysł i wrażliwość na piękno wyrastały z głębokiej kultury łacińskiej.

Profesor Joszt był naszym najlepszym mistrzem i nauczycielem, przyjacielem i kolegą. Myśli jego i dążenia pozostały w naszych sercach, gdzie zapisały się złotymi głoskami.

Cześć Jego pamięci.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1957, 6, 107-114

J. Baranowska and *D. Shugar*

THE ROLE OF PROTEINS IN, AND THE QUESTION OF LOCALIZATION OF, THE GRAM REACTION

From Department of Biochemistry, State Institute of Hygiene, Warszawa
Received 3 November 1956

During the course of earlier studies pointing to the participation of proteins in the Gram reaction (Shugar a. Baranowska, 1954a, 1954b) we came across several strains of microorganisms which exhibited clearly defined localization of the Gram stain and which were found to lend themselves readily to more detailed studies involving both this phenomenon as well as the role of proteins in the reaction.

Considerable attention has been devoted to the question of the site of gram staining in bacteria. It is, of course, obvious that if the site of the reaction could be limited to some specific constituent or area of the cell, this would be of value in attempts to further elucidate the nature of the Gram complex. That all organisms do not necessarily stain uniformly is indicated by the gram-positive granules frequently found in cells which are normally regarded as gram-negative or gram-variable and, in the case of thermophilic bacteria excellent illustrations exist of well defined granules (Georgi et al., 1951) which are gram-positive (Jarmolinska a. Shugar, 1955) and to which structural and metabolic significance may be ascribed (Burns a. Militzer, 1953).

Widespread interest has been evoked by the work of Henry a. Stacey (1946) purporting to show that the site of the Gram reaction is the bacterial cell wall, a finding which, if substantiated, would be of considerable importance, e. g. in elucidating the mode of action of certain antibiotics. But the evidence in favour of this hypothesis, notwithstanding its attractiveness, leaves much to be desired (Mitchell a. Moyle, 1950; Bartholomew a. Mittwer, 1952; Shugar, 1954).

It would appear reasonable to expect that, if the bacterial cell wall alone is responsible for the Gram reaction, it should be possible, by suitable reduction of the intensity of the stain, to obtain cells stained

on the periphery such as one normally observes when using a cell wall stain. Churchman (1927) attempted in this way to localize the site of the stain and did in fact find that *B. anthracis* retained the stain, but only irregularly, along the periphery while the „core" appeared negative. A similar attempt with yeast cells (Deletang, 1933) gave no clear-cut results.

More recently Lammanna a. Mallette (1950), using a differential staining technique, were able to demonstrate that the cell walls of some vegetative cells stain gram-positive; but their results did not enable them to exclude the participation of the protoplasm in the reaction.

It should be pointed out that one of the principal difficulties hampering accurate localization of the site of staining is the fact, long ago observed by Benians (1920) that rupture of the cell membrane results in the loss of staining ability. The findings of Schumacher (1926) which, according to Mitchell a. Moyle (1950), invalidate Benian's observation, are in reality not at all pertinent since the experimental conditions employed by Schumacher in no way resemble the gram-staining procedure.

MATERIALS AND METHODS

Most of our experiments were carried out on a strain of *Azotobacter* (Beijerincki), from the University of Warsaw collection, cultivated on the medium of Fred, Baldwin a. McCoy (1932) at a temperature of 29°C for periods of from 4 to 10 days. A few experiments included a strain of *B. cereus* accidentally isolated from the air, and several strains of *B. subtilis* from the collection of the State Institute of Hygiene.

In all cases the organisms were washed several times in water and then suspended in physiological saline. Proteins used included 4x recrystallized isoelectric lysozyme prepared according to the method of Alderton a. Fevold (1946); 5x recrystallized ovalbumin prepared according to Kekwick a. Cannan (1936); BHD protamine, used without further purification; and Worthington preparations of crystalline pepsin and trypsin. All proteins were made up in stock solutions of 4—8 mg/ml. To 0.25 ml. of protein solution was added 0.25 ml. of a suspension of bacteria and 0.5 ml. of 0.2 M buffer at *pH* values ranging from 3.6 to 10. These suspensions were then maintained at temperatures of 37°C or 60°C for appropriate intervals, following which the cells were washed and smears prepared for stain ing. Cells were gram stained according to the method of Hucker and control preparations were made on the same slide so as to avoid possible variations in conditions.

RESULTS AND DISCUSSION

Initial observations were made an a strain of *B. cereus* which, in the early spore-forming stage, was found to exhibit clearly defined localization of the gram stain on the cell periphery. On the assumption that polysaccharides were involved, the cells were treated with lysozyme at neutral *pH*. Instead of the expected loss in staining ability, it was found that the cell peripheries were now even more intensly gram positive. Protamine and albumin, but to a lesser degree, gave similar results. Examination of a number of *B. subtilis* strains revealed one (*B. subtilis* 32, PZH) which exhibited similar behaviour. We therefore have here two examples of localization of the Gram reaction on the cell periphery as well as an intensification of this reaction through the binding of foreign proteins with widely differing isoelectric points, in the absence of nucleic acids, if we accept recent analyses of the composition of bacterial cell walls (S a l t o n, 1953).

Subsequent searches for other organisms exhibiting selective localization of the Gram stain resulted in the finding of a strain of *Azotobacter* (Beijerincki) which stained lightly, but definitely, on the cell periphery, including also the capsule. Because of its larger size and long and complex cycle of development, further observations were confined to this organism.

Vegetative cells of *Azotobacter* are usually classified as gram-negative (J e n s e n, 1954) although L ö h n i s a. W e s t e r m a n n (1909) have observed a certain number of gram-positive cells. Fig. 1a shows a typical gram-stained preparation of 4-day old cells. Although retention of stain by the cell periphery is feeble, it becomes more marked with older cells, as shown by the photographs of 7-day old cells in Figs. 1b and 1c. The stained area includes both the capsule and cell wall. In older cells the stain is even more intense but rather irregular.

Exposure of such cells to protein solutions results in a marked intensification of staining which is dependant on the age of the cells, the kind of protein used, the *pH* of the medium and whether the organisms are viable or heat-killed prior to exposure to the protein. „Flash-heating" at 100°C for 5 minutes was used for killing the organisms. Typical stained preparations are shown in Figs. 2, 3, 4 and 5. The relative number of cells rendered gram-positive (as observed by eye under the microscope) after 1, 2 and 18 hours at various *pH* values is illustrated in the accompanying table for several proteins.

Of particular interest is the fact that pepsin and trypsin, under these conditions, were without effect (see also below).

		hours	*pH*							
			3.6	4.1	5.1	6.2	7.0	8.1	9.1	10
Protamine	Live cells	2	+−−−	+−−−	+−−−	++−−	++−−	++−−	+−−−	+−−−
		18	++−−	++−−	++−−	++−−	+++−	+++−	+−−−	+−−−
	Killed cells	2	+−−−	++−−	++−−	++−−	++++−	+++−	++−−	+−−−
		18	++−−	++−−	++−−	+++−	++++−	+++−	++−−	++−−
Lysozyme	Live cells	2	++−−	++−−	++−−	++−−	+++−	++−−	+−−−	+−−−
		18	++−−	++−−	+++−	+++−	+++−	++−−	++−−	+−−−
	Killed cells	1	+−−−	++−−	++−−	++−−	++−−	++−−	+−−−	+−−−
		2	++−−	++−−	++−−	+++−	+++−	++−−	+−−−	+−−−
		18	++−−	++−−	+++−	+++−	++++−	+++−	++−−	+−−−
Ovalbumin	Live cells	2	++−−	++−−	++−−	++−−	++−−	+−−−	+−−−	+−−−
		18	++−−	+++−	+++−	+++−	++−−	+−−−	+−−−	+−−−
	Killed cells	2	++−−	++−−	++−−	++−−	++−−	++−−	+−−−	++−−
		18	++−−	+++−	++++−	+++−	+++−	++−−	++−−	++−−

In most instances the addition of protein results in a marked intensification of the Gram reaction only of the cell peripheries. However, in Fig. 2 we have an example where, in the presence of lysozyme, it is the cytoplasm which stains very intensely; similar results were obtained with protamine and ovalbumin.

The similarity between the above results and those of Tomcsik a. Gueux-Holtzer (1954) is striking. The latter authors found that the capsules of a number of organisms could be made readily visible under the phase microscope if the cells were first suspended in a solution of some protein; the extent of protein uptake was found to be dependant on the *pH* of the medium; in general the higher the isoelectric point of the protein, the higher the *pH* of maximum uptake of protein. From the above table it will be noted that a similar result prevails here, although our observations are not as extensive as those of Tomcsik a. Gueux-Holtzer. Particularly interesting is the fact pepsin and trypsin were without effect in their experiments, as in ours. We have been able to confirm the uptake of protein by the cell capsule and the cell wall, by direct observation under the phase microscope as was done by Tomcsik a. Gueux-Holtzer, and by means of the electron microscope. Furthermore a rough correlation exists between the extent of protein uptake and the intensity of the resultant Gram reaction.

We have also verified the uptake of protein by the bacterial cells by direct measurement of removal of protein from a solution in which the organisms were suspended for a definite time interval.

Although the *pH* dependance of the Gram reaction, elicited as a result of protein uptake, is suggestive of the formation of salt-like linkages with some components of the bacterial cell, it is unlikely that this is the only explanation since pepsin and trypsin are without effect. The results of Tomcsik a. Gueux-Holtzer with casein also indicate that other types of binding may be involved.

Of interest in connection with the above are the observations of Bisset a. Hale (1953) on the cytology and life cycle of *Azotobacter chroococcum*. Figs. 8 and 9 in their publication show some cells at certain stages of the growth cycle, which take the Gram stain on the cell wall alone (not including the capsule) or in the cytoplasm. These results provide further confirmation of localization of gram staining; furthermore such localization is not limited to the cell wall.

Occasionally reproduction by gonidia was observed in cultures of *Azotobacter*. These were usually small and gram-negative, like those mentioned by Bisset a. Hale (1953), and became completely gram-positive in the presence of protein, without any indication of localization of the stain.

Attempts to intensify the staining reaction by exposing the cells to magnesium ribonucleate, instead of proteins, according to the method of Henry a. Stacey (1946) were without effect. It should also be noted, in this connection, that the participation of nucleic acids in the staining reactions of these cells is rather unlikely in view of the fact that several observers have demonstrated the absence of nucleic acids both in the cell walls and the capsules of various organisms, both gram-positive and gram-negative (Shugar, 1954). In agreement with this is our finding that ribonuclease does not affect the staining reaction of *Azotobacter*.

As mentioned above, normal gram-positive cells lose the ability to stain if they are no longer intact (Benians, 1920), and this has been interpreted as implying some role in the Gram reaction either to the cell wall permeability or the structural integrity of either the cell membrane or the entire cell. We therefore investigated the behaviour of some of the above preparations under these conditions. In Fig. 1c some of the cells, prior to staining, were mechanically ruptured by passing a sharp razor blade across the heat-fixed smear; along the direction indicated by the arrow can be seen a number of cell fragments and it will be noted that these retain the stain. A similar result is obtained if the cells are first exposed to protein, in order to obtain a more intense stain, and again ruptured before staining. Finally, if the organisms are exposed for an hour or longer to higher concentrations of lysozyme (about 5 mg/ml) some of the cells are disintegrated, probably as a result of enzymatic action, and here too the fragments retain the stain quite effectively.

These results differ from what one would normally expect and should be taken into account in any attempt to explain the nature of the staining reaction. On the other hand it must be borne in mind that the effect of mechanical rupture of cells on gram staining properties has not been studied on a very wide variety of organisms and it is therefore perhaps not justified to apply this finding to all organisms.

If we assume that the staining of the cell fragments outlined above is a real Gram reaction, then it follows that Gram staining of extracellular material may be possible. Various reports have appeared in the literature on Gram staining of cell-free substances (see Bartholomew a. Mittwer, 1952; Shugar, 1954) but such results have been criticized by Bartholomew a. Mittwer (1952) on the grounds that the staining techniques were not adequately described and no suitable controls were used. Of interest in connection with the results described above for the *Bacillus* strains is the claim of Gianni et al. (1954) that a polypeptide isolated from the peripheries of *B. subtilis* stains gram-positive. Because of the presence also of polysaccharides in the cell walls and capsules of bacteria, we attempted to stain several purified polysaccharides and found that these did indeed take the Gram stain, some of them very intensely; however, further investigation showed that several other substances did as well, so that it is not permissible to draw any definite conclusions from these findings, which will be reported elsewhere (Shugar a. Baranowska 1956).

The demonstration of the uptake of proteins by bacteria is of some importance from other points of view. For example Barer *et al.* (1953) have proposed a refractometric method for the determination of the dry mass of bacterial cells. The principle of the method consists in suspending the cells in a medium in which the refractive index is adjusted to

Plate I

Gram stained cells of *Azotobacter beijerinckii* (see text for details) (1350×)

Fig. 1. *a* — 4-day old cells, *b* — 7-day old cells, *c* — as in *b* but from different culture

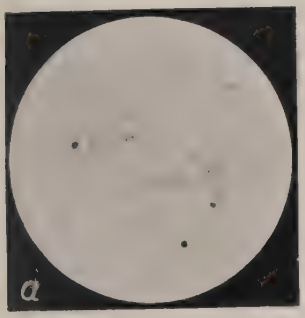
Fig. 2. 4-day old cells after treatment with lysozyme: *a* — at *pH* 5, *b* — at *pH* 9

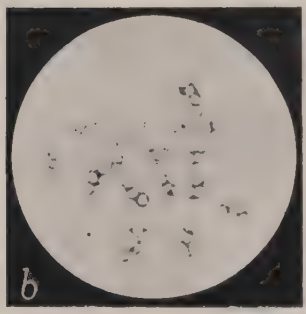
Tablica I

Metoda Grama, *Azotobacter beijerinckii* (szczegóły w tekście)

Fot. 1. *a* — Komórki z hodowli 4-dniowej, *b* — komórki z hodowli 7-dniowej, *c* — jak w *b*, lecz z innej hodowli

Fot. 2. Komórki z 4-dniowej hodowli po zadziałaniu lizozymem. *a* — o *pH* 5. *b* — o *pH* 9





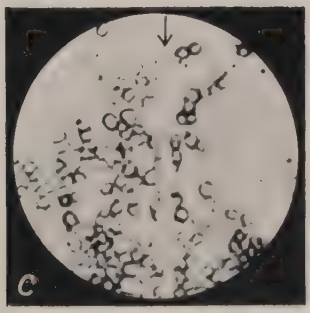
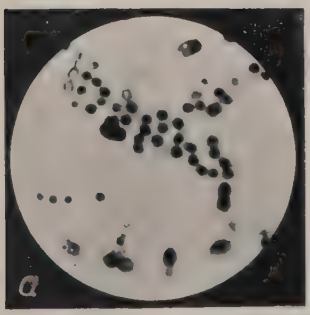


Fig. 1



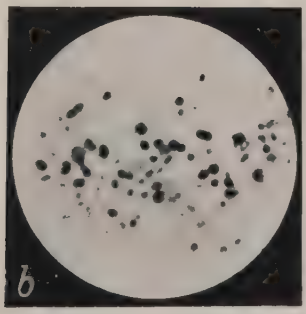


Fig. 2

Plate II

Fig. 3. 7-day old killed cells after treatment with lysozyme: *a* — at *pH* 6, *b* — at *pH* 8

Fig. 4. 7-day old killed cells after treatment with protamine: *a* — at *pH* 7, *b* — at *pH* 9

Fig. 5. 7-day old killed cells after treatment with ovalbumin: *a* — at *pH* 5, *b* — at *pH* 8

Tablica II

Fot. 3. Zabite komórki z 7-dniowej hodowli po zadziałaniu lizozymem: *a* — o *pH* 6, *b* — o *pH* 8

Fot. 4. Zabite komórki z 7-dniowej hodowli po zadziałaniu protaminą: *a* — o *pH* 7, *b* — o *pH* 9

Fot. 5. Zabite komórki z 7-dniowej hodowli po zadziałaniu albuminą jaja kurzego: *a* — o *pH* 5, *b* — o *pH* 8

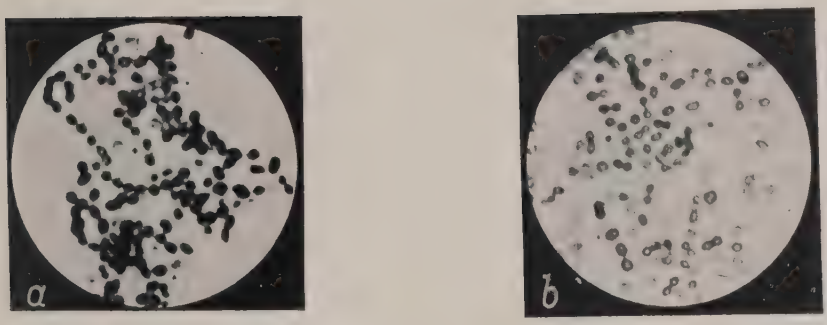


Fig. 3

Fig. 4

Fig. 5

equal that of the organisms; the substance selected as most suitable for adjustment of the refractive index of the medium is albumin, the assumption being made that proteins are not taken up by the cells. Although we have not made an extensive quantitative measurements of protein uptake by *Azotobacter*, we have found that this may amount to 5% and more of the dry weight of the cells, a quantity by no means insignificant. Roberts *et al.* (1955), who used isotopically labelled proteins to measure the intercellular volume of bacterial cells, did in fact obtain results indicating that one may not assume *a priori* that no protein is attached to the cell surface or penetrates the cell membrane, even during the short interval of a few minutes required for a single experiment.

Note added in proof: Since submission of the above manuscript we have come across another example of localization of gram staining, in the fungus *Mucor racemozus*. When cultivated under non-aerobic conditions in the presence of M 300 sodium arsenate the periphery of the oidia of this fungus stains gram-positive while the remainder of the cell is gram-negative. Under the influence of lysozyme the entire cells become positive. Neither ribonuclease nor trypsin cause any change in the staining character of the heat-killed cells. In some instances application of ribonuclease resulted in the removal of part of the cell periphery without, however, any change in its staining characteristics.

BIBLIOGRAPHY

Alderton G., a. Fevold H. L., 1946: Direct crystallization of lysozyme from egg white and some crystalline salts of lysozyme. *J. Biol. Chem.*, **164**; 1.

Barer R., Ross K. F. a. Tkaczyk S., 1953: Refractometry of living cells. *Nature*, **171**; 720.

Bartholomew J. W. a. Mittwer T., 1952: The Gram Stain. *Bact. Rev.*, **16**; 1.

Benians T. H. C., 1920: A further investigation into the principles underlying Gram's stain, with special reference to the bacterial cell membrane. *J. Path. Bact.*, **23**; 401.

Bisset K. A., a. Hale C. M. F., 1953: The cytology and life cycle of *Azotobacter chroococcum*. *J. Gen. Microbiol.*, **8**; 442.

Burns L. a. Militzer W., 1953: Organelle nature of a cell granule from a thermophilic bacterium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **82**; *411.*

Churchman J. W., 1927: The structure of *B. anthracis* and the reversal of the Gram reaction. *J. Exp. Med.*, **46**; 1007.

Deletang R., 1933: Contribution à l'étude de la coloration de Gram. Les Presses Modernes, Paris.

Fred E. B., Baldwin I. L. a. McCoy E., 1932: cited in „Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria". Biotech Pubs., Geneva, N. Y.

Georgi C. E., Militzer W., Burns W. a. Heotis J., 1951: On the existence of a cell granule in a thermophilic bacterium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **76**; 596.

Gianni A., Zamboni A., Torre B. D. a. Novatti C. C., 1954: *Boll. Ist. Sieroter. Milanese*, **33**; 129.

Henry H. a. Stacey M., 1946: Histochemistry of the Gram staining reaction for microorganisms. *Proc. Roy. Soc.* (London) *B*, **133**; 391.

Jarmolińska A. a. Shugar D., 1955: 6th Congress of Polish Society of Microbiologists, Poznań. (*Acta Microbiol. Polon.*, 1956, **5**; 101).
Jensen H. L., 1954: The *Azotobacteriaceae*. *Bact. Rev.*, **18**; 195.
Kekwick R. A. a. Cannan R. K., 1936: The hydrogen ion dissociation curve of the crystalline albumin of the hen's egg. *Biochem. J.*, **30**; 232.
Lammanna C. a. Mallette M. F., 1950: The relation of the Gram stain to the cell wall and the ribonucleic acid content of the cell. *J. Bact.*, **60**; 499.
Löhnis F. a. Westermann T., 1909: Ueber stickstoffixierende Bakterien. *Zentr. Bakter. II*, **22**; 234.
Mitchell P. a. Moyle J., 1950: Occurrence of a phosphoric ester in certain bacteria; its relation to Gram staining and penicillin sensitivity. *Nature*, **166**; 218.
Roberts R. B., Cowie D. W., Abelson P. H., Bolton E. T. a. Britten R. N., 1955: Studies of biosenthesis in *E. coli*. *Carnegie Inst. of Wash.* Pub. № 607.
Salton M. R. J., 1953: Studies of the bacterial cell wall: IV. The composition of the cell wall of some gram-positive and gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **10**: 512.
Schumacher J., 1926: Zur Gramschen Färbung. *Zentr. Bakter. I*, **98**; *104*.
Shugar D., 1954: Nature and mechanism of the Gram stain. *Post. Hig. i Med. Doświad.* **8**; 57.
Shugar D. a. Baranowska J., 1954a: Studies on the Gram stain. The importance of proteins in the Gram reaction. *Acta Microbiol. Polon.*, **3**; *11*.
Shugar D. a. Baranowska J., 1954b: Studies on the Gram stain: Conversion of natural gram-negative organisms to the gram-positive state. *Bull. Acad. Polon. Sci., Cl. II*; **1**.
Shugar D. a. Baranowska J., 1956. *Biochim. Biophys. Acta.*
Tomcsik J. a. Gueux-Holtzer S., 1954: Demonstration of the bacterial capsule by means of a *pH*-dependant saltlike linkage with proteins. *J. Gen. Microbiol.*, **10**; 97.

J. Baranowska i *D. Shugar*

ROLA BIAŁEK I ZAGADNIENIE LOKALIZACJI REAKCJI PRZY BARWIENIU METODĄ GRAMA

Streszczenie

Stwierdzono, że u niektórych szczepów rodzaju *Bacillus* we wczesnych stadiach przetrwalnikowania oraz u *Azotobacter beijerinckii*, strefa barwiąca się gramdodatnio jest zlokalizowana w zewnętrznych warstwach komórek.

Intensywność barwienia znacznie zwiększa się, a u *Azotobacter* zmienia się czasem lokalizacja zabarwienia, pod wpływem umieszczenia komórek w roztworach białek. Kwasy nukleinowe nie wywierają podobnego wpływu. Zależność tego zjawiska od *pH* wskazuje, że kompleksy białkowe, od których zależna jest gramdodatniość, mają charakter soli. Uzyskane dane przemawiają przeciw poglądowi przypisującemu kwasom nukleinowym główną rolę w barwieniu metodą Grama.

U azotobaktera rozbicie komórki nie wywołuje, zwykle obserwowanej w takich warunkach, utraty gramdodatniości.

Wyniki badań zostały omówione przy uwzględnieniu teorii mechanizmu barwienia metodą Grama.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1957, 6, 115-132

J. Brill i *S. Gołębiowski*

SZCZEPY *BRUCELLA SUIS* WYDZIELONE ZE ŚWIŃ PO RAZ PIERWSZY W POLSCE *

Z Wojewódzkiego Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Łodzi i Katedry Mikrobiologii Wydziału Weterynaryjnego SGGW w Warszawie

Wpłynęło 20 lutego 1957 r.

W gospodarstwie uspołecznionym T prowadzony jest chów świń od roku 1953. Świnie zgrupowane są w chlewni macior, liczącej 50 macior i 3 knury, oraz w chlewni tuczników — liczącej około 170 sztuk świń. Oproszenia macior w jesieni 1953 r. i na wiosnę 1954 r. przebiegały normalnie, oproszenia zaś jesienne 1954 r. dały duże straty w postaci bardzo licznych przypadków poronień, które według informacji kierownictwa fermy wystąpiły u 44 macior przeważnie w drugim miesiącu ciąży. Na wiosnę 1955 r. ponownie stwierdzono liczne przypadki poronień.

Przeprowadzone przez nas kompleksowe badania rozpoznawcze w gospodarstwie T w kierunku brucelozy wykazały zakażenie pałeczkami *Brucella* bydła, koni, świń, psów i ludzi. Szczegóły tych badań podaliśmy w publikacji przekazanej do druku w Rocznikach Nauk Rolniczych, Sekcja Weterynaryjna, 1956 r. (Brill i Gołębiowski 1957). Z poronionych cieląt wydzielono szczep *Brucella abortus*.

Stopień nasilenia brucelozy wśród zwierząt domowych i ludzi gospodarstwa T oraz wśród dzikich gryzoni, odłowionych na terenie gospodarstwa (szczury), względnie odstrzelonych na terenach okolicznych (zające), stwierdzony badaniami serologicznymi i bakteriologicznymi, przedstawia tabela I.

* Odnośne szczepy oznaczone jako *Brucella suis, Łódź 1, Łódź 4*, znajdują się w Kolekcji Drobnoustrojów Polskiej Akademii Nauk pod sygnaturą 730 56/1 i 731/56/4.

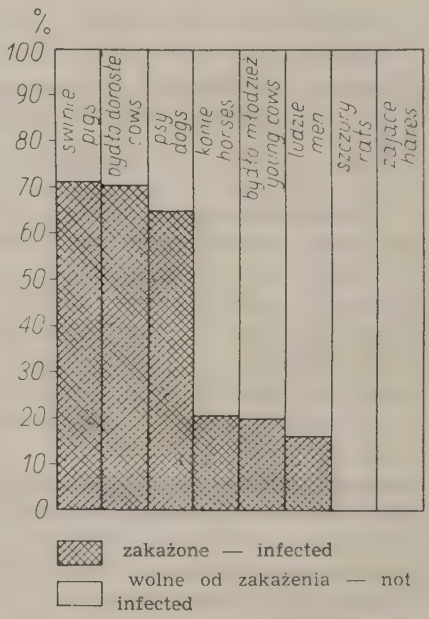
MATERIAŁY

W roku 1955 przebadano bakteriologicznie i biologicznie: 1) 8 płodów poronionych, pochodzących od 2 macior, 2) narządy wewnętrzne i węzły chłonne maciory poddanej ubojowi z konieczności, a reagującej serologicznie dodatnio w kierunku brucelozy, 3) jądra od 3 kastrowanych knurów, reagujących serologicznie ujemnie, 4) narządy wewnętrzne i węzły chłonne warchlaka, poddanego ubojowi diagnostycznemu, reagującego serologicznie ujemnie, 5) narządy wewnętrzne i węzły chłonne maciory, poddanej ubojowi diagnostycznemu, która poroniła i reagowała serologicznie dodatnio, 6) wypływ z dróg rodnych 1 maciory, reagującej serologicznie dodatnio, 7) narządy wewnętrzne i węzły chłonne 15 macior poddanych ubojowi normalnemu po wytuczeniu, z których to macior serologicznie dodatnio reagowało 6, wątpliwie 2, ujemnie 7.

Tabela I

Nasilenie brucelozy w populacji ludzi i zwierząt domowych oraz dzikich gryzoni w PGR „T" — w procentach

Brucellosis among men and animals in State Estate „T". Per cent of infected among examined groups



METODYKA BADAŃ

1. Badania bakteriologiczne

Do badań bakteriologicznych używano podłoży stałych i płynnych. Jako podłoża stałe stosowano: agar wątrobowy o *pH* 7,0 z dodatkiem 2% glicerolu i 1% glikozy; agar odżywczy o *pH* 7,0 z dodatkiem 1% glikozy i 5% jałowej surowicy końskiej inaktywowanej w temperaturze 56° w ciągu 30 minut. Jako podłoże płynne stosowano: bulion odżywczy z dodatkiem 1% glikozy i 5% surowicy końskiej inaktywowanej, *pH* pożywki 7,0.

Materiał do badań wysiewano jednocześnie na podłoża stałe i płynne; zasiane podłoża inkubowano w temperaturze 37° w warunkach: a) zwiększonego ciśnienia CO_2 oraz b) normalnego ciśnienia atmosferycznego. Czas inkubacji na podłożach płynnych wynosił 7 dni, po czym dokonywano przesiewu z podłoża płynnego na podłoże stałe. Czas inkubacji podłoży stałych wynosił 21 dni.

2. Próby biologiczne

Równolegle do badań bakteriologicznych prowadzono badania biologiczne wyżej wymienionych materiałów. Do badań tych używano świnek morskich; w celu wykluczenia u świnek brucelozy pobierano od nich przed zakażeniem krew do badań serologicznych. Skontrolowane w ten sposób świnki morskie zakażano podskórnie rozcierem narządów wewnętrznych, rozcierem węzłów chłonnych, względnie rozcierem gruczołów płciowych lub zawartością żołądków płodów poronionych. Z reguły zastrzykiwano 0,8 do 1 ml zawiesiny badanych tkanek lub płynów. Począwszy od trzeciego tygodnia po zakażeniu, co pewien czas, przeciętnie co dwa tygodnie, kontrolowano krew zakażonych świnek morskich na obecność swoistych zlepników dla szczepów *Brucella*. Odczyn zlepny nastawiano w rozcieńczeniach surowicy od 1 : 5 do 1 : 80, względnie do wysokości miana. Jako antygenu używano zawiesinę zabitych pałeczek *Brucella* (szczep Weybridge 99) produkcji Instytutu Weterynarii w Puławach.

Czas obserwacji zakażonych świnek morskich wynosił 12 tygodni. Świnki morskie reagujące dodatnio usypiano, po czym przeprowadzano dokładne badania anatomo-patologiczne oraz bakteriologiczne organów miąższowych i węzłów chłonnych.

3. Określanie typu *Brucella*

Rozpoznawanie i typowanie wydzielonych przez nas w primokulturze szczepów *Brucella* oparto na badaniach morfologicznych, biochemicznych i serologicznych. Zgodnie z zaleceniami Komisji Ekspertów Światowej Organizacji Zdrowia (1950) różnicowanie typów *Brucella* uwzględniało zapotrzebowanie dwutlenku węgla, wytwarzanie H_2S, aktywność ureazy, klasyczne testy bakteriostatyczne z użyciem zasadowych barwików anilinowych, test zahamowania wzrostu przez dwuetylotiokarbaminian sodu według Renoux. Dla określenia struktury antygenowej szczepów stosowano jednoswoiste surowice anty-*abortus* i anty-*melitensis*.

4. Formy *S* i *R*.

Do typowania używaliśmy wyłącznie szczepów postaci *S* ze względu na to, że postać *R* może dawać mylne wyniki. Do różnicowania form *S* i *R* stosowaliśmy test akryflawinowy, według B e n d t s e n a (1954). Używano neutralnej akryflawiny produkcji Firmy Abbott z Chicago.

5. Zapotrzebowanie na CO_2

Jak wiadomo, poszczególne typy *Brucella* różnią się swoimi wymaganiami, jeśli chodzi o wzrost na podłożach sztucznych. *Brucella suis* i *B. melitensis* nie wymagają do wzrostu zwiększonego cząstkowego ciśnienia CO_2, gdy tymczasem dla uzyskania primokultury *Brucella abortus* bezpośrednio z materiału potrzebne jest z reguły zwiększone ciśnienie cząst-

kowe bezwodnika węglowego. Moment ten znalazł w naszych badaniach pełne uwzględnienie.

6. Wytwarzanie H_2S

Typy *Brucella* różnią się między sobą zdolnością do wytwarzania H_2S. Cecha ta nie jest jednak stała dla poszczególnych typów *Brucella*. W celu wykazania tej cechy badane szczepy wysiewaliśmy na agar skośny odżywczy o *pH* 6,8 z dodatkiem 1% glikozy i 5% inaktywowanej surowicy końskiej. Po wysiewie szczepu na agar umieszczaliśmy w probówce na głębokości około 3 cm poniżej korka wyjałowiony pasek bibuły, namoczony uprzednio w 10-procentowym roztworze wodnym octanu ołowiu i z kolei wysuszony. Czas obserwacji rozciągał się na 5 dni.

7. Aktywność ureazy

Próba typowania pałeczek *Brucella* przez określenie aktywności ureazy opiera się na tym, że szczepy *B. suis* posiadają bardziej aktywną ureazę aniżeli szczepy *B. abortus* i *B. melitensis*. Do próby tej używaliśmy podłoża o *pH* 7,0 (według Picketta i współpracowników):

mocznik 4,0 g,
dwuzasadowy fosforan sodu 0,1 g,
jednozasadowy fosforan potasu 0,1 g,
czerwień fenolowa 0,002 g,
woda destylowana 100,0 ml.

Do gęstej zawiesiny 48-godzinnej hodowli *Brucella* w 0,85% NaCl (5.10^9 bakterii w 1 ml) w ilości 1 ml, dodawaliśmy w równej ilości opisane powyżej podłoże — wskaźnik, pozostawiając całość w temperaturze pokojowej. Zmiana barwy podłoża z żółtej (słomkowej) na czerwoną wskazuje na działanie ureazy i rozkład mocznika. Aktywność ureazy określa się czasem potrzebnym do wystąpienia zmiany zabarwienia podłoża. Szczegóły zachowania się szczepów typowych i badanych ujęte są w tabeli II.

8. Działanie bakteriostatyczne barwików

Do wykazania bakteriostatycznych własności barwików w stosunku do badanych szczepów używaliśmy fuksyny zasadowej, tioniny, fioletu metylowego, pyroniny B, dwuetylotiokarbaminianu sodu. W badaniach bakteriostatycznych stosowaliśmy metodę Cruickshanka, posługując się paskami z bibuły filtracyjnej napojonej roztworami poszczególnych barwików, oraz metodą Picketta i współpracowników, posługując się tabelkami barwikowymi.

Metoda Cruickshanka. Na dnie wyjałowionej płytki Petriego umieszcza się 2 paski cienkiej bibuły filtracyjnej o szerokości 5 mm, wyjałowione i nasycone: jedne — wodnym roztworem fuksyny zasadowej 1 : 300, drugie — wodnym roztworem tioniny 1 : 800 (*Thioninum purum*

G.. Grübler and Co, Lipsk). Przed umieszczeniem w płytkach paski należy wysuszyć. Wodne roztwory barwików powinny być wyjałowione w aparacie Kocha. Oba paski umieszcza się na dnie płytki równolegle w odległości 6 cm. Następnie paski zalewa się podłożem na grubość około 6 mm. Jako podłoże stosowaliśmy agar odżywczy o *pH* 7,0 z dodatkiem 1% glikozy i 5% inaktywowanej surowicy końskiej. Na tak przygotowane podłoże wysiewano badany szczep w postaci zawiesiny o mniej więcej jednakowej ilości bakterii w 1 ml. W tym celu badany szczep wysiewano uprzednio na skośny agar odżywczy o składzie wyżej podanym i po 48 godzinach inkubowania zawieszano spłukaną masę hodowli bakteryjnej w płynie fizjologicznym, ustalając gęstość na 3 miliony bakterii w 1 ml. Z kolei 1 oczko (średnica 2 mm) zawiesiny drobnoustrojów wysiewano na przygotowane podłoże barwikowe, prostopadle do przebiegu pasków. Na jednej płytce badano jednocześnie 3 szczepy.

Metoda Picketta. Typowanie szczepów przeprowadziliśmy według techniki podanej przez Bendtsena i przy pomocy tabletek barwikowych nadesłanych przez Dr. Christiansena, a wyprodukowanych przez firmę Roskilde Medical Company Ltd. Dania. Jako podłoża używaliśmy „Tryptone Glucose Extract Agar, Difco" o *pH* 7,0. Płytki z podłożem przed wysiewem szczepu umieszczaliśmy na 2 dni w termostacie o temperaturze 37° w celu wysuszenia. Szczepy określano w warunkach wzrostu przy normalnym ciśnieniu tlenu i w warunkach zwiększonego ciśnienia CO_2. Badane szczepy wysiewaliśmy na agar skośny i dopiero z niego przesiewaliśmy na przygotowane w uprzednio podany sposób płytki. Badany szczep zawieszaliśmy w płynie fizjologicznym i z kolei 0,1 ml zawiesiny o gęstości 10^{10} bakterii w 1 ml umieszczaliśmy na środku płytki z podłożem, po czym dokładnie rozcieraliśmy na całej powierzchni podłoża. Pośrodku płytki umieszczano tabletkę barwikową, po jednej na każdą płytkę, po czym wstawiano płytki na 1 dzień do chłodni o temperaturze 4°, następnie przenoszono płytki na 5 dni do termostatu o temperaturze 37°. Wynik badania odczytywaliśmy przez pomiar w mm średnicy strefy zahamowania wzrostu bakterii. Używaliśmy 5 różnych tabletek barwikowych o średnicy 9 mm i grubości 1 mm. Poszczególne tabletki zawierały: a) 1,80 mg fuksyny zasadowej, b) 1,72 mg tioniny, c) 0,415 mg fioletu metylowego 2B, d) 0,08 mg pyroniny B, e) 1 mg dwuetylotiokarbaminianu sodu (NDDTC).

9. Badania serologiczne

Znaczenie badań serologicznych w typowaniu szczepów *Brucella* oparte jest na różnicach w ich składzie antygenowym. Wszystkie szczepy *Brucella* posiadają antygeny *M* i *A*, jednak pomiędzy poszczególnymi typami zachodzą wybitne różnice ilościowe w wyposażeniu antygenowym. W szczepach *B. abortus* stosunek antygenów *M* do *A* wynosi 1 : 20,

Tabe

Typowanie szczepów *Brucella* —

Lp. No	Sygnatura szczepu No of strain	Gatunek zwierzęcia z którego wydzielono szczep Source of isolation (animal)	Materiał z którego wydzielono szczep habitat	Forma szczepu określona testem akriflawinowym Phase of strain S or R	Zapotrzebowanie CO_2 CO_2 requirement	Aktywność biochemiczna Production of	
						H_2S	ureaza*
1	*Łódź 1*	świnia pig	najądrze epidymis	S	—	—	1
2	*Łódź 2*	„	najądrze epidymis	S	—	—	1
3	*Łódź 3*	„	wyciek z pochwy vaginal secretion	S	—	—	1
4	*Łódź 4*	„	wyciek z pochwy vaginal secretion	S	—	—	1
5	*300*	krowa cow	płód bovine foetus	S	+	+	1
6	*789*	„	„	S	+	+	30
7	*258*	„	„	S	+	+	45
8	*318*	„	„	S	+	+	60
9	*721*	„	„	S	+	+	45
10	*633*	„	„	S	+	+	60
11	*C-T*	„	„	S	+	+	10
12	*170*	„	„	S	+	+	60

Szczepy *Brucella* kontrolne —

	Weybridge					
	544			S	—	+	45
	167			S	—	—	180
	114			S	—	—	1

Cechy szczepów *Brucella* typowych według danych z piśmiennictwa —

	+	+	> 20
	—	—	> 20
	-	—***	do 15

* rozkład mocznika w minutach — urea decomposition after minutes

** aglutynacja słabo zaznaczona — agglutination very weak

la II

Characteristics of isolated *Brucella* strains

Właściwości bakteriostatyczne barwików Bacteriostatic test							Aglutynacja z surowicami monospecyficznymi Agglutination test in monospecific sera Titer		Typ określony Type diagnosed
Metoda Picketta – Pickett's method					Metoda Cruickshanka Cruickshank's method				
fuksyna zasadowa basic fuchsin	tionina thionin	fiolet metylowy methyl violet	pyronina pyronin	NDDTC	fuksyna zasadowa basic fuchsin	tionina thionin	anty-*abortus*	anty-*melitensis*	
45	25	30	40	1			200		*B. suis var. thomseni*
45	25	32	37	1	–	+	200 ++++	–	*B. suis var. thomseni*
45	25	32	40	1	–	+	200 ++++	–	*B. suis var. thomseni*
45	25	32	40	1	–	+	200 ++++	–	*B. suis var. thomseni*
25	20	25	30	1	•	•	100 ++++	–	*Brucella.* Typ przejściowy
25	35	20	25	1	•	•	400 ++++	–	*B. abortus*
25	35	17	20	0	•	•	200 ++++	–	*B. abortus*
20	32	15	15	0	•	•	50 ++++ 100 ++	–	*B. abortus*
20	32	17	15	1	•	•	100 ++++ 200 ++	–	*B. abortus*
22	32	20	15	0	•	•	200 ++++ 400 ++	–	*B. abortus*
22	33	20	20	1	•	•	100 ++++ 200 ++	–	*B. abortus* atypowy
20	25	18	15	0	•	•	400 ++++	–	*B. abortus* atypowy
Control strains									
25	35	25	30	1	+	–	200 ++++	–	*B. abortus*
22	20	20	30	1	+	+	–	+ **	*B. melitensis*
35	22	30	35	1	–	+	200 ++++ 400 ++	–	*B. suis*
Characteristics of types according to literature									
20—25	35—40	20—25	30—35	2	+	–	+	–	*B. abortus*
20—25	20—25	20—25	30—35	3	+	+	–	+	*B. melitensis*
35—40	20 25	30—35	35—40	1					*B. suis*

*** odmiana amerykańska wytwarza H_2S, odmiana duńska nie wytwarza H_2S
American variant is H_2S positive, Danish type is H_2S nagtive

• nie badano — not examined

a w szczepach *B. melitensis* 20 : 1. Typ *B. suis* pod względem wyposażenia antygenowego zbliżony jest silnie do typu *B. abortus*, lecz zawiera więcej antygenów *M.* W związku z tym przy pomocy surowic jednoswoistych wyprodukowanych na królikach odróżnić można jedynie szczepy typu *B. melitensis* od szczepów dwóch pozostałych typów.

W naszych badaniach serologicznych stosowaliśmy odczyn zlepny, używając surowic jednoswoistych produkcji Instytutu Medycyny Pracy i Higieny Wsi. Każdy badany szczep sprawdzany był przy pomocy trzech surowic, to jest jednoswoistej surowicy anty-*abortus*, jednoswoistej anty-*melitensis* i normalnej surowicy króliczej. Surowice jednoswoiste rozcieńczano w probówkach aglutynacyjnych do wysokości miana. Do każdej probówki dodawano na 0,5 ml rozcieńczonej surowicy jedną kroplę (0,05 ml) zawiesiny badanego szczepu w 0,85-procentowym roztworze soli kuchennej; gęstość zawiesiny około 10^{10} bakterii w 1 ml. Zawiesinę przygotowywano z 48-godzinnej hodowli szczepu *Brucella* na skośnym agarze odżywczym o *pH* 7,0, z dodatkiem 1% glikozy i 5% surowicy końskiej inaktywowanej. Probówki wstrząsano i umieszczano na 24 godziny w termostacie o temperaturze 37°, po czym pozostawiano na dwie godziny w temperaturze pokojowej i odczytywano wynik odczynu zlepnego.

WYNIKI BADAŃ

IZOLACJA SZCZEPÓW *BRUCELLA*

Przedstawiamy szczegółowo jedynie badania tych materiałów, z których udało się nam wyizolować szczepy *Brucella*. Badania zakończone ujemnym wynikiem nie będą omawiane. Szczepy *Brucella* udało się nam wydzielić jedynie dwukrotnie: raz z ropnia najądrza knura a drugi raz z wypływu dróg rodnych maciory.

1. Badanie najądrza knura.

Knur w wieku około 1 roku rasy wielkiej białej angielskiej, za życia bez klinicznych objawów chorobowych. Próba aglutynacji i OWD w kierunku brucelozy ujemna. Sekcyjnie makroskopowo stwierdzono w ogonie najądrza nieotorbiony ropień o białożółtej płynnej treści, wielkości ziarna grochu. Badanie mikroskopowe bezpośrednie (preparat barwiony metodą Kozłowskiego) ujemne. Posiewy, bezpośrednio na podłoże stałe, jak też i pośrednio poprzez podłoże płynne, dały wynik ujemny.

W dniu 26 maja zakażono: jedną świnkę morską treścią ropnia najądrza i jedną świnkę morską rozcierem najądrza. W obu wypadkach badany materiał wstrzykiwano podskórnie. Kontrolne badania serologiczne krwi świnki Nr 1 zakażonej treścią ropnia przeprowadzono kolejno w dniu 20 i 30 czerwca; zachowanie się miana zlepnego surowicy

świnki według kolejności badań przedstawiało się następująco: pierwsze badanie — aglutynacja w rozcieńczeniu 1 : 80 — — + +, drugie badanie 1 : 200 + + + +. W dniu 30 czerwca świnkę Nr 1 uśpiono. Sekcyjnie stwierdzono ostry obrzęk śledziony. Badanie bakteriologiczne narządów wewnętrznych i węzłów chłonnych świnki dało wynik ujemny.

Rozcierem narządów wewnętrznych i węzłów chłonnych świnki Nr 1 zakażono natychmiast po sekcji świnkę Nr 1a. Krew tej świnki zbadano serologicznie dnia: 27 lipca, 17 sierpnia, 29 sierpnia, 14 września i 21 września. Miana zlepne surowicy badanej świnki przedstawiają się według kolejności badań następująco: 1) —, 2) —, 3) 1 : 40 — — + +, 1 : 80 + +, 4) 1 : 80 + + + +, 1 : 160 + +, 5) 1 : 80 + + + +.

W dniu 21 września świnkę Nr 1a uśpiono. Sekcyjnie stwierdzono w wątrobie szarobiałe ogniska martwicze wielkości główki szpilki oraz ostry obrzęk śledziony. Wykonano badania bakteriologiczne narządów wewnętrznych i węzłów chłonnych (metodyka badań patrz rozdział 2). Badania dały wynik ujemny. Natychmiast po sekcji rozcierem narządów wewnętrznych i węzłów chłonnych świnki Nr 1a zakażono kolejną świnkę Nr 1b. Krew świnki Nr 1b badano serologicznie w dniach 12 października, 24 października i 2 listopada; miana zlepne surowicy przedstawiały się następująco: 1) —, 2) 1 : 160 + + + +, 3) 1 : 640 + + + +.

W dniu 2 listopada świnkę Nr 1b uśpiono. Sekcyjnie stwierdzono bardzo silne powiększenie wszystkich węzłów chłonnych oraz ropień w węźle chłonnym krezkowym. Wykonano badania bakteriologiczne narządów wewnętrznych, węzłów chłonnych oraz ropnia węzła chłonnego, krezkowego. Pałeczki *Brucella* wyhodowano z posiewu bezpośredniego na podłoże stałe z treści ropnia węzła krezkowego (szczep Nr *1*) oraz z posiewu pośredniego węzłów chłonnych tuszy (szczep Nr *2*) poprzez podłoże płynne; posiew bezpośredni węzłów chłonnych tuszy na podłoże stałe dał wynik ujemny.

Badania kontrolne serologiczne krwi świnki Nr 2 zakażonej rozcierem najądrza przeprowadzono w dniach: 20 czerwca, 30 czerwca, 7 lipca, 21 lipca, 4 sierpnia, 17 sierpnia i 29 sierpnia; zachowanie się miana zlepnego surowicy świnki Nr 2 według kolejności badań przedstawiało się następująco: 1) —, 2) —, 3) —, 4) —, 5) —, 6) 1 : 40 + + + +, 7) 1 : 40 + + + +, 1 : 80 + +. Świnkę Nr 2 uśpiono w dniu 29 sierpnia. Sekcyjnie stwierdzono w wątrobie liczne rozsiane ogniska martwicze szarobiałe, wielkości główki szpilki. Badanie bakteriologiczne dało wynik ujemny. Od dalszych pasaży materiału na świnkach morskich odstąpiono ze względu na uzyskanie szczepu *Brucella* z ropnia tego samego najądrza.

2. Badania wycieku z dróg rodnych maciory.

Badanie bezpośrednie mikroskopowe (preparat barwiony metodą Kozłowskiego) ujemne. Posiewy bezpośrednie na podłoże stałe oraz pośred-

nie, poprzez podłoże płynne, dały wynik ujemny. W dniu 26 maja 1955 r. badanym materiałem zakażono świnkę morską Nr 3. Kontrolne badania serologiczne surowicy zakażonej świnki w kierunku brucelozy przeprowadzono w dniach 20 i 30 czerwca, 7 i 21 lipca, 4, 17 i 29 sierpnia. Miana zlepne surowicy przedstawiały się w kolejności badań następująco: 1) 1 : 5 ++, 2) —, 3) —, 4) —, 5) 1 : 40 ++++, 6) 1 : 60 ++++, 1 : 320 ++, 7) 1 : 160 ++++. Świnkę Nr 3 uśpiono w dniu 29 sierpnia. Sekcyjnie stwierdzono podostry obrzęk śledziony. Badanie bakteriologiczne węzłów chłonnych i narządów wewnętrznych dało wynik ujemny. Jednocześnie rozcierem narządów wewnętrznych i węzłów chłonnych świnki Nr 3 zakażono świnkę morską Nr 3a. Krew świnki Nr 3a badano serologicznie w dniach 21 września i 10 października; miana zlepne surowicy przedstawiają się następująco: 1) —, 2) 1 : 20 ++++, 1 : 40 ++. W dniu 11 października świnka Nr 3a padła. Sekcyjnie stwierdzono duże, szarobiałe ogniska martwicze w wątrobie, ostry obrzęk śledziony, silne powiększenie węzłów chłonnych krezkowych. Posiewy bezpośrednie narządów wewnętrznych i węzłów chłonnych dały wynik ujemny. Z posiewów pośrednich poprzez podłoże płynne uzyskano wzrost pałeczek *Brucella* z rozcieru wątroby i śledziony (szczep Nr 3) oraz z węzłów chłonnych (szczep Nr 4).

CHARAKTERYSTYKA WYDZIELONYCH SZCZEPÓW *BRUCELLA*

Cechy charakterystyczne czterech, wydzielonych przez nas od dwóch świń, szczepów *Brucella* zebrane są w tabeli II. Szczepy te weszły w skład kolekcji drobnoustrojów Muzeum Polskiej Akademii Nauk, odnośne numery muzealne odnotowane są w nocie na stronie 115. W tabeli II zamieściliśmy jednocześnie dla porównania własności 8 szczepów *Brucella* wydzielonych przez Wojewódzki Zakład Higieny Weterynaryjnej w Łodzi z płodów bydła. Wśród tych szczepów szczep oznaczony Nr *C-T* pochodził właśnie z tego samego gospodarstwa, w którym stwierdziliśmy brucelozę świń.

Jako kontrolę prawidłowego przebiegu badań przy określaniu cech poszczególnych szczepów służyły nam szczepy typowe *Brucella abortus Nr 24* (szczep *Nr 584/54* Kolekcji drobnoustrojów PAN), *Brucella melitensis Nr 167* i *Brucella suis Nr 114* (otrzymane z Muzeum Instytutu Medycyny Pracy i Higieny Wsi w Lublinie) oraz szczep *Brucella abortus 544* (z Vet. Labor. Weybridge, Kolekcja drobnoustrojów PAN 673/56, szczep *Brucella melitensis C* (ze Statens Serum Institute, Kopenhagen, Nr Kolekcji Drobnoustrojów PAN 174/47) i *Brucella melitensis M16* (z Vet. Labor. Weybridge, Kolekcja drobnoustrojów PAN 675/56).

W oparciu o dokonane badania wydzielone ze świń 4 szczepy *Brucella* określiliśmy ostatecznie jako typowe *Brucella suis var. thomseni.* Wy-

dzielone przez nas szczepy zostały kontrolnie przebadane przez prof. dr A. Thomsena ze Statens Veterinere Serumlaboratorium, Kopenhaga oraz przez Instytut Medycyny Pracy i Higieny Wsi w Lublinie. Oba zakłady potwierdziły nasze oznaczenia.

Odnośnie pozostałych 8 badanych szczepów wydzielonych przez WZHW w Łodzi z bydła, to przed szczegółowym omówieniem ich cech uważamy za stosowne omówić niezgodności jakie zaistniały między wynikami naszych badań przy określaniu właściwości bakteriostatycznych barwików metodą Picketta, przy zastosowaniu tabletek z barwikami produkcji Roskilde Medical Company Ltd. Dennmark a tabelą Bendtsena, opracowaną przez autora w oparciu o tabletki barwikowe tej samej firmy. Rażącą niezgodność stwierdziliśmy w zachowaniu się szczepów w stosunku do NDDTC; według Bendtsena typowe szczepy *B. melitensis* powinny dać w obecności NDDTC 3 strefy zahamowania wzrostu, a *B. abortus* 2 strefy, gdy tymczasem w naszych badaniach szczepy typowe i szczepy wydzielone z bydła o cechach pozostałych odpowiadających *B. abortus* dały w tym teście tylko jedną strefę zahamowania wzrostu lub w ogóle nie stwierdzono działania hamującego NDDTC na wzrost niektórych szczepów. Już po dokonaniu tych badań w rozmowie osobistej z profesorem Renoux mogłem wyjaśnić, że stosowanie NDDTC w postaci tabletek diagnostycznych jest obecnie nierealne, albowiem produkt ten — jak się okazało — ulega szybko rozkładowi.

Duże różnice w zachowaniu się szczepów stwierdziliśmy w naszych badaniach w porównaniu z wynikami podanymi przez Bendtsena w odniesieniu do tabletek barwikowych z fioletem metylowym i pyroniną. Należy jednak podkreślić, że różnice te wystąpiły jedynie przy określaniu 8 szczepów wydzielonych z bydła, zachowanie się szczepów typowych muzealnych w stosunku do tych dwóch barwików odpowiadało natomiast całkowicie danym zawartym w tabeli Bendtsena. Może to przemawiać z jednej strony za słusznością wyników Bendtsena, z drugiej za pewną odmiennością w zachowaniu się szczepów *B. abortus* świeżo wydzielonych z materiałów terenowych w stosunku do tych dwóch barwików.

Prawie całkowitą zgodność naszych wyników z wynikami Bendtsena stwierdza się w działaniu fuksyny i tioniny na szczepy typowe, jak i na szczepy wydzielone z materiałów terenowych. Z tych też względów przy określaniu typu 8 badanych szczepów wydzielonych od bydła, jeśli chodzi o właściwości bakteriostatyczne barwików, bierzemy pod uwagę tylko zachowanie się szczepów w stosunku do fuksyny zasadowej i tioniny, pomijając testy z fioletem metylowym, pyroniną i NDDTC.

Uwzględniając powyższe zastrzeżenia należy uznać szczepy Nr *789, 258, 318, 721, 633* za *B. abortus*-typowe, szczepy *Nr C-T, 170* za *B. abor-*

tus-atypowe. Szczep Nr *C-T* różni się od szczepu typowego *B. abortus* większą aktywnością ureazy, a szczep *Nr 170* mniejszą wrażliwością na tioninę. Na specjalne omówienie zasługuje szczep nr *300*. Budowa antygenowa tego szczepu odpowiada budowie antygenowej *B. abortus* lub *B. suis*. Aktywność ureazy, zachowanie się w stosunku do tioniny odpowiadają szczepom *B. suis*, zapotrzebowanie CO_2 i zachowanie się w stosunku do fuksyny zasadowej odpowiadają szczepom *B. abortus*. Wytwarzanie H_2S może przemawiać bądź za przynależnością do typu *B. abortus*, bądź *B. suis* (odmiana amerykańska). Tak więc na podstawie przytoczonych wyników badań szczep ten nie może być zakwalifikowany ani do typu *B. abortus*, ani do typu *B. suis*. Jest to szczep o cechach wybitnie przejściowych.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wydzielenie szczepów *Brucella* ze świń po raz pierwszy na terenie Polski wymaga ścisłego ich określenia. Ze względów epizootiologicznych oraz epidemiologicznych nie jest rzeczą obojętną, czy wydzielony szczep jest typem *B. abortus, B. suis czy też B. melitensis*. Wiadomo bowiem, że jakkolwiek wszystkie typy *Brucella* są chorobotwórcze dla ludzi i bez mała wszystkich gatunków zwierząt domowych, niemniej jednak, jeśli chodzi o człowieka, specjalną chorobotwórczością cechują się w pierwszym rzędzie *B. melitensis* i *B. suis*, odmiana amerykańska. W szczególności szczepy *B. melitensis*, pochodzące bezpośrednio od kóz i owiec, są wybitnie chorobotwórcze dla człowieka, gdy tymczasem szczepy typowe *B. abortus*, pochodzące od bydła cechy tej — jak to podaje Stableforth (1953) — są raczej pozbawione.

B. suis odmiana amerykańska należy również do szczepów silnie chorobotwórczych dla człowieka, gdy tymczasem *B. suis* odmiana duńska, różniąca się od pierwszej tylko niezdolnością do wytwarzania H_2S, uważana jest raczej tylko za wyjątkowo chorobotwórczą dla człowieka (Huddleson 1943, Parnas i Tuszkiewicz 1956).

Przytoczone powyżej różnice chorobotwórczości poszczególnych typów pałeczek *Brucella* dla człowieka już same przez się stanowią pełne uzasadnienie dla przeprowadzenia szczegółowych badań nad typowaniem wydzielonych przez nas ze świń szczepów. Prócz powyżej podanego aspektu uzasadniającego potrzebę typowania pałeczek *Brucella*, łączy się jeszcze z typowaniem zagadnienie zmienności drobnoustrojów.

Gatunek *Brucella* obejmuje nie tylko 3 podstawowe typy, lecz także szereg szczepów atypowych lub przejściowych. Różnice pomiędzy szczepami typowymi a atypowymi sprowadzają się do różnic w spektrum aktywności biochemicznej, względnie do różnic struktury antygenowej. Pomijam w tym miejscu zagadnienie, czy mówiąc o typach *Brucella* nie

powinniśmy ewentualnie — wzorem profesora Parnasa — mówić jedynie o odmianach zamiast o typach, mam jednakowoż wrażenie, że dyskusyjnie znacznie bardziej zrozumiała staje się sprawa typowania bruceli, jeżeli staniemy na stanowisku reprezentowanym przez bez mała wszystkich badaczy tej dziedziny mikrobiologii, którzy rozróżniają trzy zasadnicze typy bruceli oraz ich odmiany czyli warianty.

Wspomniane różnice w niczym nie wykluczają morfologicznej, osobniczej zmienności oraz zmienności wzrostu na podłożach.

Od czasu klasycznych badań Pasteura nad zmiennością drobnoustrojów, uzyskiwaną przez pasaże badanego szczepu w różnych warunkach środowiskowych, wiemy, że zmienność drobnoustrojów można osiągnąć stosunkowo łatwo. Polipatogenność pałeczek *Brucella* stwarza dla tego drobnoustroju wyjątkowo dogodne warunki bytowania w różnych środowiskach, co zapewne zależne jest od dużej adaptywności enzymatycznej tego gatunku. Różnorodność środowiska, w którym *Brucella* mogą bytować, musi też odwrotnie wywierać wpływ na stałość lub zmienność przynajmniej niektórych cech drobnoustrojów. Prace badaczy angielskich podkreślają wyjątkową anomalię, jaką zaobserwowano wśród typowych szczepów *B. melitensis* wydzielonych z pokaźnej liczby krów na przestrzeni ostatnich lat w Anglii. Ludność miejscowa, która piła mleko od krów zakażonych *B. melitensis*, nie chorowała. Odnosi się wrażenie, że pasaże przez krowy wyhodowanych w Anglii szczepów *B. melitensis* spowodowały obniżenie charakterystycznej dla typu *B. melitensis* zjadliwości w stosunku do organizmu człowieka.

Uzyskiwanie zmienności typu przez pasaż poprzez organizm gospodarza „niewłaściwego" było przedmiotem badań wielu autorów. Washko, Bay, Donham, Hutchings (1951b) z 22 świń zakażonych dla celów doświadczalnych szczepami *B. abortus* wydzielili w 4 przypadkach szczepy *B. suis*. Gilman, Milks i Birch (1934) próbowali zmienić charakterystyczne cechy szczepów *B. abortus* przez pasaże na świniach. Uzyskane wyniki były jednak ujemne, pomimo że pasażowano szczep *B. abortus* kolejno przez 6 świń.

Washko i współpracownicy (1951a) badali właściwości chorobotwórcze szczepów *B. abortus* wydzielonych ze świń przez Mc Cullogha i doszli do wniosku, że nie różnią się one pod względem chorobotwórczości dla świń od szczepów *B. abortus* wydzielonych z bydła.

Cameron i Meyer (1952) pasażowali seryjnie szczep *Brucella S 19* przez 21 świń, czas przebywania szczepu w organizmie świń wynosił 406 dni. Szczep wyhodowany w końcowej fazie doświadczenia nie wykazał odchyleń w porównaniu ze szczepem wyjściowym w teście tolerancji względem barwików oraz w teście zjadliwości, mierzonym uszkodzeniami śledziony zakażonych świnek morskich.

Ten krótki przegląd prób sterowanej zmienności cech charakteryzujących poszczególne typy *Brucella* drogą eksperymentu biologicznego zdaje się wskazywać na to, że niektóre szczepy poszczególnych typów mogą wykazywać zmienność przynajmniej pewnych cech. Poza tym niektóre dane wskazują na to, że każdy z typów *Brucella*, natrafiając na wrażliwego gospodarza spośród różnych gatunków zwierząt, może stać się dla niego pasożytem nie zmieniając przy tym charakterystycznych cech wyjściowych. Zagadnienie zmienności pałeczek *Brucella* drogą biologicznego eksperymentu przez współhodowlę *in vivo* w organizmie kury zakażonej *Salmonella pullorum*, było przedmiotem badań i publikacji Brilla (Brill i Frendzel 1936). W wyniku tych badań uzyskano z organizmu kur współzakażonych szczepami *Brucella* i szczepami *S. pullorum* szczepy *Brucella* zlepiające się surowicą swoistą anty-*pullorum*.

Parnas (1956) donosi o możliwościach wywołania zmienności niektórych cech charakterystycznych dla typu przez współhodowlę dwóch różnych typów pałeczek *Brucella in vitro* (hybrydyzacja wegetatywna). Stałość cech nabytych w ten sposób nie została przez autora sprawdzona ze względu na zaginięcie szczepu.

Badane przez nas szczepy *Brucella*, określone jako *Brucella suis* — *Łódź 1, 2, 3, 4*, wydzielone ze świń okazały się szczepami typowymi *B. suis*, odmiana duńska. Stwierdzenie tego faktu ma duże znaczenie epidemiologiczne, ponieważ odmiana duńska w przeciwieństwie do odmiany amerykańskiej należy do szczepów mało chorobotwórczych dla ludzi. Tym też należy przypuszczalnie tłumaczyć fakt, że pomimo niezwykle dużego rozprzestrzenienia się brucelozy wśród trzody chlewnej PGR-Turzynów, a tym samym dużego zagęszczenia zarazka w środowisku w związku z częstymi ronieniami i nie przestrzeganiem przez personel obsługujący przepisów sanitarno-higienicznych, obsługa chlewni w liczbie 3 osób pozostała — jak mogliśmy stwierdzić na podstawie wywiadu i badań serologicznych — w pełni zdrowia.

Szczep *Brucella* wydzielony z płodu bydlęcego a pochodzący od krowy z tego samego gospodarstwa, w którym stwierdzono u świń szczepy *B. suis*, określiliśmy jako *B. abortus* atypowy (Nr *C-T*). Wśród 6 osób personelu obsługującego bydło w PGR Turzynów stwierdziliśmy 2 przypadki brucelozy, co może być związane z większą zjadliwością szczepu *Brucella* dla ludzi w ogólności lub ze zwiększonymi możliwościami zakażenia się ludzi przy kontakcie z bydłem. Jeśli bowiem chodzi o obsługę chlewni, to zakażenie ludzi mogło dojść do skutku przez kontakt lub też drogą aerogenną podczas oczyszczania pomieszczeń, natomiast w przypadku obsługi obory należy wziąć pod uwagę — w większym jeszcze stopniu — trzeci sposób zakażania się pałeczkami *Brucella*, mia-

nowicie drogą pokarmową przez picie surowego mleka i stosunkowo znacznie większy kontakt człowieka z bydłem przy porodach. Nie bez wpływu będzie także w takich wypadkach ilość zarazka z jaką się styka człowiek przy porodzie lub w wypadku poronienia krowy zakażonej.

Odnośnie zmienności pałeczek *Brucella* należy podkreślić następujące obserwacje. W naszych dodatkowych badaniach natrafiliśmy aż na trzy szczepy, które bezwzględnie przemawiają za występowaniem zjawiska zmienności aktywności biochemicznej i wrażliwości na środki bakteriostatyczne wśród szczepów należących do rodzaju *Brucella*. Szczep Nr *300* jest tego przekonywającym dowodem. Szczep ten w oparciu o przeprowadzone przez nas badania (stosowana metodyka stanowi obecnie bez mała wszędzie podstawę do określania typu) nie może być zakwalifikowany ani do typu *B. abortus*, ani do typu *B. suis*. Jest to szczep o cechach wybitnie odbiegających od cech typowych, a może on się „wywodzić" zarówno z typowego szczepu *B. abortus*, jak i z typowego szczepu *B. suis*. Szczep ten został przez nas wyizolowany z poronionego płodu bydlęcego.

Na specjalne omówienie zasługuje metodyka i technika izolacji szczepów *B. suis*. Należy podkreślić, że wydzielenie „primokultury" *B. suis* z materiału zakażonego jest, jak wynika z naszych badań, związane z dużymi trudnościami. Zastosowanie do badań bakteriologicznych jedynie tylko podłoży stałych i płynnych, specjalnie przydatnych do wzrostu pałeczek *Brucella*, w naszych badaniach pomimo przeprowadzenia setek posiewów nie dało w żadnym przypadku dodatnich wyników.

Przypuszczalnie jest to związane ze zbyt małą ilością zarazków w badanym materiale. Dopiero dzięki użyciu do badań świnek morskich, a zatem próby biologicznej, udało nam się wydzielić szczepy *B. suis*. Jednak i w eksperymencie biologicznym natrafia się na trudności. Hodowle założone na pożywkach wybiórczych stałych i płynnych z zakażonych organów świnek morskich mogą być ujemne pomimo wysokiego miana zlepnego surowicy świnki (miano 1 : 200) oraz zmian sekcyjnych świadczących o zakażeniu (ostry obrzęk śledziony). Dlatego też dla uzyskania dodatnich wyników konieczne jest kolejne zakażenie następnych świnek w pasażu do pewnego stopnia ślepym, aż do uzyskania w hodowli poszukiwanego szczepu *Brucella*. W naszym przypadku szczepy *B. suis* oznaczone numerami *1* i *2* wydzieliliśmy dopiero po trzecim pasażu „ślepym" na świnkach morskich, a szczepy numer *3* i *4* po drugim. Z tego rodzaju trudnościami spotykali się również i inni badacze, np. Tiewosow i Annagiew (1956) oraz Kołomakin (1956). Donoszą oni o dodatnich mianach (1 : 160) zlepnych u zakażonych świnek, z których pomimo to nie uzyskano szczepów *Brucella*.

Poza tym należy uznać wyższość pożywek wybiórczych płynnych nad stałymi przy zakładaniu hodowli z materiału zakażonego, nie zanieczyszczonego postronną florą bakteryjną. Z takim to właśnie materiałem mamy przeważnie do czynienia przy badaniu narządów świnek morskich użytych do prób biologicznych. Wysiew na podłoże płynne umożliwia namnożenie się pałeczek *Brucella*, których ilość w tkankach zwierząt zakażonych — jak to często bywa — jest nieznaczna. W naszych badaniach na 4 wyizolowane szczepy *Brucella* 3 wyhodowano jedynie dzięki stosowaniu podłoży płynnych (posiewy bezpośrednio na podłoża stałe były ujemne), a zaledwie 1 wyhodowano z wysiewu bezpośredniego na podłoże stałe i to z ogniska, w którym nagromadzenie zarazka musiało być siłą rzeczy duże, a mianowicie z ropnia węzła krezkowego.

Odnośnie czasu obserwacji świnek morskich zakażonych materiałem badanym na obecność *Brucella*, to w oparciu o nasze doświadczenia, czas ten powinien być przedłużony do 12 tygodni. Obserwacja 6-tygodniowa, powszechnie zalecana, nie pozwala na uchwycenie wszystkich zwierząt, które by mogły ewentualnie zareagować dodatnim mianem serologicznym wskutek zakażenia. Uśpienie świnki morskiej serologicznie ujemnej już po 6 tygodniach obserwacji i przeprowadzeniu w tym czasie badań bakteriologicznych daje mniej szans wydzielenia zarazka niż przeprowadzenie badań bakteriologicznych po wystąpieniu pozytywnego miana zlepnego. W naszych badaniach świnka morska Nr 1a zareagowała serologicznie dodatnio między siódmym a dziewiątym tygodniem od chwili zakażenia, świnka morska Nr 3 między ósmym a dziesiątym tygodniem, a świnka Nr 2 między dziesiątym a dwunastym tygodniem.

* * *

1. Jako przyczynę ronienia macior ustalono zakażenie wywołane przez *Brucella suis var. thomseni* (*B. suis* odmiana duńska).

2. Jeden szczep wydzielono z ropnia najądrza knura (szczep *B. suis Łódź 1*), drugi z wycieku organów rodnych maciory (szczep *B. suis Łódź 4*) *. Wydzielone szczepy *B. suis* posiadały wszystkie cechy typowe dla *B. suis* odmiana duńska.

3. Szczepy *B. suis* zostały wydzielone ze świń po raz pierwszy w Polsce.

4. Drogą posiewów bezpośrednich na wybiórcze podłoża stałe i płynne nie udało się wydzielić szczepów *Brucella*, pomimo licznych bardzo prób. Szczepy *Brucella* wydzielono dopiero dzięki zastosowaniu „ślepych"

* Szczepy znajdują się w Kolekcji Drobnoustrojów Polskiej Akademii Nauk pod sygnaturami: 730/56/1, 731/56/4.

pasaży badanych materiałów przez świnki morskie (dwa względnie trzy pasaże).

5. Zalecany powszechnie 6-tygodniowy czas obserwacji zakażonych eksperymentalnie świnek morskich okazał się w stosunku do naszych szczepów niewystarczający. Świnki morskie zakażone badanym materiałem zareagowały serologicznie dopiero między 7 a 12 tygodniem od chwili zakażenia.

6. Szczep *Brucella* wydzielony z płodu bydlęcego z tego samego gospodarstwa został określony przez nas jako *Brucella abortus* „atypowy".

7. Przebadane porównawczo szczepy *Brucella* wydzielone z płodów bydlęcych z województwa łódzkiego w 5 przypadkach wykazały cechy charakterystyczne dla typu *B. abortus*, w 1 przypadku cechy atypowe *B. abortus* a w 1 przypadku cechy *B. abortus typ* przejściowy.

8. Test bakteriostatyczny barwikowy według metody Picketta z zastosowaniem tabletek produkcji Roskilde Medical Company Ltd. Denmark okazał się w użyciu praktyczniejszy od innych testów bakteriostatycznych barwikowych.

9. Test Renoux z NDDTC (sodium diethylthiocarbamate) w postaci tabletek okazał się nie przydatny, przypuszczalnie wskutek rozkładu preparatu w składowych tabletkach.

LITERATURA

Bendtsen H. 1954: On type differentiation of Brucella Bacteria. *Nord. Vet. Med.* **6**: 355.

Brill J., Frendzel J. 1936: Paraaglutynacja doświadczalna dwóch gatunków drobnoustrojów hodowanych razem in vivo w kurze. *Med. Dośw. i Społ.* T. **XXI**: 418.

Brill J., Gołębiowski St. 1956: Bruceloza świń. *Med. Dośw. i Mikr.* **2**: 244.

Brill J., Gołębiowski St. 1957: Kompleksowe środowiskowe badania brucelozy. *Rocz. Nauk Roln.* T. **68—E—1**: 93.

Cameron H., Meyer M. 1952: An Attempt to a Alter the Characteristics of Brucella Abortus by Serial Passage Through Swine. *The Cornell Vet.* **1**: 42.

Gilman H., Milks C., Birch R. 1934: Passage of Bovine Brucella through Swine. *J. Inf. Dis.* **54**: 171.

Huddleson I. F. 1943: Brucellosis in Man and Animals, New York. The Commonwealth Fund.

Kołomakin G. A. 1956: Rol kleszczej siemejstwa Ixodidae w epizootiołogii brucelleza. *Wiet.* **6**: 33.

Parnas J., Tuszkiewicz A. 1956: Bruceloza. PZWL. Warszawa.

Parnas J. 1956: Próby doświadczalnego przeobrażania cech odmian pałeczek Brucella. *Acta Micr. Polonica. Vol.* **V**: 45.

Rozanow H. 1952: Mikrobiołogiczeskaja diagnostyka zabolewanij s. ch. ż. Sielchozgiz, Moskwa.

Stableforth A. W. 1953: World Health Org., Monograph Series. Nr. 19. Advances in the control of zoonoses. Geneva.

Tiewosow A. M., Annagiew A. A. 1956: Ku woprosu o prirodnych oczagach brucelleza. *Wiet.*, **6**: 33.
Thomsen A. 1934: Brucella infection in swine. Kopenhaga.
Washko F., Hutchings L., Bay W., Donham C. 1951a: Studies on the Pathogenicity of Brucella suis for Cattle — II. *Amer. J. Vet. Res.*, **12**: 165.
Washko F., Bay W. W., Donham C. R., Hutchings L. 1951b: Studies of the Pathogenicity of Brucella abortus for Swine — I. *Amer. J. Vet. Res.*, **12**: 320.
Harnach R. 1957: Epizootologická komplexnost brucelózy. Pokroky vo Výskume Brucelózy; *Vyd Slov. Akad. Vied. Bratislawa: 65.*
Thomsen A. 1957: Brucellainfektion beim Schwein und ihre Beziehung zur Brucellainfektion beim Haasen. Pokroky vo Výskume Brucelózy; *Vyd. Slov. Akad. Vied. Bratislawa*: 184.
Niznansky F. i współprac. 1957: Prispevok k epizootologii brucelózy polných zajacov na Slovensku. Pokroky ku Výskume Brucelózy. *Vyd. Slov. Akad. Vied. Bratislava*: 199.
Katalog Drobnoustrojów. 1956: Wyd. PAN. Komisja Naukowa dla Spraw Kolekcji Drobnoustrojów. Warszawa.

J. Brill and *S. Gołębiowski*

THE FIRST ISOLATION OF *BRUCELLA SUIS* FROM PIGS IN POLAND

Summary

Many cases of abortion in sows obserwed in one of Goverment Estate were shown to be due to infection with *Brucella suis var. thomseni.*

Two strains were isolated — one from the abcess of a epidymis of a boar, second from the secretion of female genital tract.

These strains, were diagnosed as typical *B. suis* strains.

It is the first case of isolation of *B. suis* from pigs in Poland *.

It was found that for the isolation of *B suis* the method of choice is the passage of infectious material through guinea-pigs. In most cases at least three „blind" passages are needed before the isolation on nutrient media in possible.

The period of observation of infected guinea-pigs should be prolonged up to 12 weeks; the formation of specific antibodies very often in observed not earlier. then 7-12 weeks after the infection.

Routinely used selective liquid and solid media were shown to be not suitable for isolation of *B. suis* directly from infected animals.

In the district, where above mentioned strains have been isolated, number of animals were examined. One atypical strain of *B. abortus* was isolated from aborted bovine foetus. Among seven strains isolated at the same time from bovine foetuses in Łódź-Voievodztwo five were diagnosed as typical *B. abortus*, one as atypical *B. abortus* and one as intermedium *B. abortus.*

It was shown that in differentiation of *Brucella* species the most useful is Pickett's test (bacteriostatic action of dyes) performed with dye — tabletes produced by Roskilde Medical Co LTD.

The results obtained with NDDTC (Renoux's test) were inconclusive. probably due to the decomposition of the active substance during storage.

* The strains mentioned are included in the collection of Microorganisms of Polish Academy of Science under the numbers: 730/56/1 and 731/56/4.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1957, 6, 133-169

J. Kwapiński

BUDOWA CHEMICZNA I ANTYGENOWA MACZUGOWCÓW

Z Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej Akademii Medycznej w Warszawie
Wpłynęło dnia 30 października 1956 r.

TREŚĆ

Część I. Budowa chemiczna maczugowców błonicy

1) Ogólny opis składu chemicznego komórki
2) Tłuszcze
3) Cukry
4) Substancje białkowe
5) Toksyna maczugowców błonicy

Część II. Budowa antygenowa maczugowców błonicy

A. Badania serologiczne całych komórek
B. Badania immunologicznych właściwości wyosobnionych frakcji komórkowych
1) Antygeny cukrowe
2) Antygeny białkowe
3) Antygeny lipidowe
4) Własności antygenowe toksyny błoniczej
5) Właściwości biologiczne antygenów maczugowca

BUDOWA CHEMICZNA MACZUGOWCÓW BŁONICY

1. OGÓLNY OPIS SKŁADU CHEMICZNEGO KOMORKI

Jakościowy skład chemiczny maczugowców błonicy nie zależy od składu pożywki (Hottinger 1933), poziom niektórych pierwiastków, np. fosforu waha się natomiast w zależności od wieku hodowli.

Protoplazma komórek maczugowca błonicy zawiera:

84,5% wody
10,9% składników organicznych
4,6% popiołu.

Zawartość głównych pierwiastków w suchej masie maczugowców:

48,9%	węgiel,
9,75 - 12,8%	azot,
8,6%	wodór,
około 30,0%	tlen.

Tamura (1914) wykrył w suchej masie maczugowców błonicy hodowanych 5 dni na bulionie 9,75% azotu.

Zawartość azotu w poszczególnych frakcjach aminokwasowych, (według schematu von Slyke'a) obrazuje poniższe zestawienie:

N-amidowy	12,30%,
N-huminowy	1,29%,
N-dwuaminowy	32,86%,
N-jednoaminowy i nieaminowy	53,04%,
N-aminowy	44,80%,
N-nieaminowy	8,40%,
N-ogólny	99,49%.

Stężenie azotu w maczugowcach błonicy nie ulega zmianie z wiekiem hodowli (Hirsch 1932, Biełozerski, Korczagin i Smirnow 1955), stężenie fosforu w maczugowcach obniża się natomiast równolegle do przedłużenia okresu hodowli. Obrazuje to tabela I:

Tabela I

Wiek hodowli	Azot ogólny	Fosfor ogólny
1 doba	12,80	2,14
2 dni	12,70	1,73
6 dni	12,80	0,65
10 dni	12,80	0,60

Wyciągi z dwudniowych hodowli zawierają 50% forsforu w związkach organicznych; w starszych hodowlach w związkach organicznych znajdowano tylko 5-10% fosforu, w związkach nieorganicznych zaś 90-95%. Wskazywałoby to, że w starszych komórkach odbywają się głębsze procesy rozpadu komórkowego.

Odsetek głównych składników organicznych w stosunku do suchej masy maczugowców błonicy wynosi:

tłuszcze	4,9- 9,0%,
węglowodany	5,0-11,0%,
białka	63,4-84,0%.

Enzymy maczugowców:

W szczepach drobnoustrojów należących do rodzaju *Corynebacterium* opisano bliżej dotychczas niewiele enzymów. Należą tu:

a) Z grupy hydrolaz — proteazy.

Aktywność enzymów proteolitycznych maczugowców błonicy wykazali Dernby i Walbum (1923) oraz Saissac i Reynaud (1951); szczegółowe badania nad proteazą wewnątrz i poza komórką szczepu

PW_s wykonała Smirnowa (1955). Aktywność proteaz określono według narastania stężenia N resztkowego w stosunku do całkowitego N w wyniku autolizy i wyrażano procentem w stosunku do suchej masy. Aktywność proteazy wahała się zależnie od wieku hodowli. W hodowli przewietrzanej stwierdzono działanie tylko wewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych. W hodowli głębinowej obserwowano natomiast aktywność pozakomórkowych proteaz. Proteazy maczugowców błonicy są podobne do katepsyn; aktywność ich zwiększa się pod wpływem cystyny, glikozy i jonów żelaza oraz zależy od *pH*, będąc najwyższą w *pH* 8.

b) Z grupy desmolaz: katalazę i hydrogenazę octanową.

Katalaza maczugowców błonicy odznacza się dużą aktywnością, q katalazy wynosi 9000. Enzym ten wykryto również w komórkach *C. hofmannii*. Badania nad oczyszczonymi preparatami katalazy wykonali również Kwapiński i Piekacz (1956); Prévot i Thouvenot (1952) wykryli aktywność tego enzymu u 5 spośród 33 szczepów bezwzględnych beztlenowców (*C. avidum* i *C. liquefaciens*).

Dehydrogenazę octanową z komórek *C. creatinovorans* wyosobnili Barron, Ardao i Hearon (1950.

2. TŁUSZCZE

Maczugowce błonicy zawierają stosunkowo niewiele substancji tłuszczowych: 4,9% (Chargaff 1931), 6,73% (Gubariew i współpracownicy 1952), aż do 9% suchej masy maczugowców (Kwapiński 1956). Większa część substancji tłuszczowych znajduje się w stanie wolnym (tłuszcze „zapasowe"); mniejsza część występuje w kompleksach złożonych z kwasów tłuszczowych i węglowodanów lub kwasów tłuszczowych i białek. Możliwe, że lipidy są wiązane jeszcze przez inne składniki struktury komórkowej.

Gubariew i jego współpracownicy dzielili „wolne" lipidy maczugowców na wolne kwasy tłuszczowe, mikrozydy i woski. Mikrozydy znajdują się w rozpuszczalnej w acetonie frakcji ekstraktu acetonowego i ekstrakcie chloroformowym. Woski zawarte są w małej ilości w rozpuszczalnej w acetonie frakcji otrzymanej z ekstraktu benzolowego i w ekstrakcie chloroformowym.

Lipidy wolne można wyekstrahować eterem i alkoholem, benzolem i chloroformem lub acetonem i eterem oraz olejem parafinowym. Lipidy „związane" natomiast ekstrahuje się łatwo mieszaniną alkoholu i eteru (1 : 1) z dodatkiem 1-procentowego kwasu solnego.

Niektórzy autorzy ograniczyli swe badania jedynie do lipidów wolnych, nie podając zresztą bliżej charakterystyki otrzymanych frakcji (Wong i T'Ung 1938 a, b, 1939 a, b, c, 1940 a, b, c, Orłowa 1950, 1953).

Tamura (1914) wyizolował dwie frakcje tłuszczowe: lipidy ekstrahowane eterem i fosfatydy ekstrahowane alkoholem. Frakcja eterowa po zagęszczeniu i oczyszczeniu (punkt topnienia 180°) nie zawierał fosforu; barwiła się dodatnio metodą Grama, była niekwasooporna. Fosfatyd o charakterze żółtobrunatnej masy zawierał fosfor i azot i należał do typu monoamino-monofosfatydu, podobnie jak lecytyna.

Chargaff (1931, 1933) uzyskał następujące frakcje:

tłuszcz rozpuszczalny w acetonie	3,97%
tłuszcz trudno rozpuszczalny w acetonie	0,25%
fosfatyd nierozpuszczalny w acetonie	0,41%
woski	0,27%
ogółem	4,90%

Zawartość tłuszczów rozpuszczalnych w acetonie wzrastała z wiekiem hodowli: w czwartym dniu wynosiła już 4,82%, w ósmym 6,42%, w czternastym 7,9% suchej masy.

W tłuszczach jedynym nasyconym stałym kwasem tłuszczowym był kwas palmitynowy; stanowił on około 30% wszystkich kwasów tłuszczowych. Z płynnych nienasyconych kwasów tłuszczowych występował głównie kwas heksadecenowy $CH_3(CH_2)_5 — CH = CH(CH_2)_7 \cdot COOH$ oraz kwas o wzorze sumarycznym $C_{14}H_{26}O_2$ (1% wszystkich kwasów). Poza tym wyosobniono nienasycony kwas dyfterynowy $C_{15}H_{68}O_2$ o punkcie topnienia 35-36°. Stwierdzono ślady kwasu masłowego, stearynowego i cerotynowego.

Z fosfatydów po hydrolizie uwalniają się aldoheksozy, kwasy tłuszczowe, bliżej nieokreślony składnik o wysokim ciężarze cząsteczkowym i ślady zasady. Wykryto w nich nasycony kwas palmitynowy i płynne kwasy tłuszczowe, głównie kwas koryninowy $C_{19}H_{37}(OH)_2 \cdot COOH$, o punkcie topnienia 70-71°.

Pudles i Lederer (1951, 1953) wyizolowali z maczugowców błonicy, zidentyfikowali oraz zsyntetyzowali kwas tłuszczowy nazwany kwasem korynomykolinowym, o wzorze sumarycznym $C_{32}H_{64}O_3$, temperatura topnienia 70°, $(\alpha)D = +7,5°$. Wzór strukturalny

$$CH_3—(CH_2)_{14}—CH \quad CH—COOH$$

$$OH \quad C_{14}H_{29}$$

Frakcjonując następnie nienasycone kwasy tłuszczowe towarzyszące kwasowi korynomykolinowemu wyizolowali nowy związek nazwany kwasem korynomykoleinowym. Jest to kwas β (+)-2-tetradekonoino-3-hydroksyoleinowy. Analiza chemiczna tego związku wykazała: C 77,31 — 77,13%, H 12,42—12,53%. Wzór sumaryczny $C_{31}H_{62}O$, temperatura topnienia 80°. Kwas ten po redukcji katalitycznej przyłącza drobinę wodoru i daje cząsteczkę kwasu korynomykolinowego.

Kwas korynomykolinowy, zdaniem autorów, może być wytwarzany w komórkach przez kondensację cząsteczki kwasu palmitynowego z cząsteczką kwasu palmitooleinowego. Dwa te kwasy tłuszczowe tworzą około 15% lipidów znajdujących się w maczugowcach błonicy.

Ponadto wykryto kwasy mirystynowy, behenowy, lignocerynowy, heneikozanowy i oktokozenowy oraz cis-Δ^7-palmiton o wzorze sumarycznym $C_{31}H_{60}O$.

Dokładne badania nad lipidami maczugowców błonicy szczepu PW_8 wykonał zespół Gubariewa (Gubariew i współpracownicy 1945, 1948, 1951, 1952, 1953). Izolowali oni poszczególne frakcje lipidowe z 1748,5 g suchej masy bakteryjnej, otrzymanej po wysuszeniu przepłukanych wodą hodowli szczepu PW_8.

Lipidy wyekstrahowane benzolem stanowiły 4,9% suchej masy maczugowców po odpędzeniu benzolu strumieniem CO_2 tworzyły brunatną masę konsystencji wosku.

Wyciąg chloroformowy maczugowców zawierał zespół lipidów, który po odpędzeniu chloroformu tworzył brunatną mazistą masę, stanowiącą 1,83% suchej masy bakterii (łącznie wyekstrahowane lipidy stanowiły więc 6,73% suchej masy maczugowców). Lipidy wyekstrahowane chloroformem rozfrakcjonowali badacze na 5 części. Miały one następujące właściwości: liczba jodowa 41, liczba zmydlenia 179,1, liczba neutralizacji 61,8. Odczyn Molischa dodatni. Wyciąg chloroformowy nie wykazywał właściwości redukujących, po zhydrolizowaniu w kwasie siarkowym zawierał natomiast substancje redukujące. Po acetylowaniu uzyskano krystaliczny octan trehalozy w postaci igieł. Temperatura topnienia 80°.

Właściwości poszczególnych frakcji wydzielonych z ekstraktu benzolowego zestawiono w tabeli II.

W dalszych badaniach poszczególnych frakcji lipidowych otrzymano szereg podfrakcji.

Z części frakcji *A*, rozpuszczonej w gorącym alkoholu, wykrystalizowały podczas oziębienia kolejno 4 podfrakcje. Właściwości kwasów tłuszczowych wydzielonych z frakcji *A* przedstawiono w tabeli III.

Na uwagę zasługuje kwas tłuszczowy o wzorze sumarycznym $C_{78}H_{76}O_2$; podobnego kwasu nie wykryto dotychczas w innych frakcjach lipidów bakteryjnych.

W części frakcji *A*, nierozpuszczalnej po zmydleniu w alkoholu, rozpuszczalnej dobrze w rozcieńczonych kwasach i niezupełnie rozpuszczalnej w wodzie, wykryto mikrozydy, etery węglowodanu z wyższymi kwasami tłuszczowymi. Substancja ta wykazywała dodatni odczyn Molischa i zawierała 0,58% fosforu. Odczyn orcynolowy był słabo dodatni, odczyn Szerera-Salkowskiego (na inozytol) ujemny, odczyn z aniliną dodatni. Po 8-godzinnej hydrolizie ilość substancji redukujących wyniosła 2,2%. Cu-

Tabela II

Frakcja	Postać i konsystencja	Rozpuszczalność	Temperatura topnienia	Liczba			%			
				jodowa	zmydlenia	neutralizacji	N	P	kwasów tłuszczowych	substancji redukujących
A	białe płatki	alkohol, eter aceton, benzol chloroform	65,5–77,5	3,19				0,54		2,2
B	jasnobrunatna twarda	eter, nierozpuszczalny w acetonie, alkoholu	172	20,36	136	0	0,24	1,45	88	7,3
G	biały proszek	eter, nierozpuszczalny w acetonie, alkoholu, benzynie	59—60	39,94	106,5			0,11		
E	ciemnobrunatna półpłynna	eter, aceton		71,6	181,6	120		0		0

Tabela III

Podfrakcja	Barwa i konsystencja	Temperatura topnienia	Liczba neutralizacji	Liczba jodowa	Ciężar cząsteczkowy	Skręcalność	Teoretyczna częstotliwość	Przypuszczalny wzór empiryczny
I	bezbarwna twarda	70,4	—	0	566,98	0	564,99	$C_{38}H_{76}O_2$
II	bezbarwna twarda	57,5	175,1	0	320,25	0	326,33 lub 312,52	$C_{21}H_{42}O_2$ $C_{20}H_{40}O_2$
III	bezbarwna twarda	59,7	191,1	0	293,8	0	298,30	$C_{19}H_{38}O_2$
IV	jasnożółta twarda	49,1	174,3	30,6	321,7	0	324,31	$C_{21}H_{42}O_2$

kru nie zidentyfikowano z powodu małej ilości substancji. Na podstawie dodatniego odczynu z aniliną można przypuszczać, że w skład mikrozydu maczugowców błonicy wchodzą pentozy. Nie jest jednak wyłączona obecność heksoz związanych z pentozami. We frakcji *B* i *G* wykryto trehalozę. Jako kwasy tłuszczowe w skład mikrozydów wchodzą kwasy nasycone C_{38}, C_{21-22} i C_{19} oraz kwas nienasycony C_{19}.

Właściwości kwasów tłuszczowych wydzielonych z frakcji *B* przedstawia tabela IV.

Frakcja *E* składa się z wolnych kwasów tłuszczowych i wosków (tłuszczów obojętnych). Cztery podfrakcje wolnych kwasów tłuszczowych wypadły kolejno z roztworu frakcji *E* w gorącym etanolu, po ochłodzeniu. Właściwości ich podaje tabela V.

Tabela IV

Nr podfrakcji	Barwa	Konsystencja	Temperatura topnienia	Liczba jodowa	Liczba neutralizacji	Liczba acetonowa	Przypuszczalny wzór	Nazwa proponowana
1	biała	twarda	70	0	106,4	86,6	$C_{34}H_{67}O_3$	kwas α—oksykorynowy
2	biała	twarda	64	5,67	106,4	—	$C_{35}H_{68}O_2$	kwas α—korynowy
3	biała	twarda	59	0	106,4	96,7	$C_{34}H_{67}O_3$	kwas β—oksykorynowy
4	biała	twarda	44—45	21,2	109,9	—	$C_{34}H_{66}O_2$	kwas β—korynowy
5	biała	twarda	—	44,7	128,1	144,7	—	—

Tabela V

Nr podfrakcji	Barwa	Konsystencja	Temperatura topnienia	Liczba jodowa	Liczba neutralizacji	Liczba acetonowa	Ciężar cząsteczkowy	Wzór empiryczny
1	kremowa	twarda	61,3	27,6	137,8	0	407,1	$C_{26}H_{53}O_2$
2	jasnokremowa	twarda	68,2	4,6	146,4	85,9	383,1	$C_{24}H_{45}O_2$
3	biała	twarda	59,1	3,7	215,8	0	259,1	$C_{16}H_{32}O_2$
4	brunatna	półpłynna	35	62,4	165,2	0	338,7	$C_{22}H_{42}O_2$

Właściwości kwasu tłuszczowego podfrakcji 1 są zbliżone do kwasu cerotynowego; podfrakcja 2 to nasycony oksykwas, prawdopodobnie z nieznaczną domieszką nienasyconych kwasów (mała liczba jodowa).

Podfrakcję 3 tworzy kwas palmitynowy; podfrakcję 4 tworzy nienasycony kwas tłuszczowy z jednym podwójnym wiązaniem, zbliżony do kwasu erukowego.

Podobne kwasy tłuszczowe wykryto już poprzednio w prątkach gruźlicy typu ludzkiego, w prątkach tymotki, trądu, oraz w *Lactobacillus acidophilus*.

Woski frakcji *E* są to etery wysokocząsteczkowych jednowartościowych alkoholi ($C_{23}H_{45}OH$) z wyższymi kwasami tłuszczowymi. Woski frakcji *E* po zmydleniu alkoholowym roztworem KOH rozdzielono na trzy podfrakcje: I — mydła potasowe kwasów tłuszczowych, II — sole ołowiowe kwasów tłuszczowych, III — mydła potasowe kwasów tłuszczowych. Kwasy tłuszczowe wydzielono z ich soli po zakwaszeniu kwasem solnym w obecności eteru etylowego. Po oddzieleniu wymienionych 3 frakcji kwasów tłuszczowych pozostała frakcja IV — wysokocząsteczkowy alkohol. Właściwości uzyskanych kwasów tłuszczowych i alkoholu podano w tabeli VI.

Wysokocząsteczkowy jednoatomowy alkohol tworzący IV podfrakcję jest prawdopodobnie identyczny z alkoholem korynowym, wyosobnio-

Tabela VI

Nr podfrakcji	Barwa	Konsystencja	Liczba jodowa	Liczba neutralizacji	Liczba podwójnych wiązań	Liczba acetylowa	Wzór empiryczny	Ciężar cząsteczkowy obliczony	Ciężar cząsteczkowy teoretyczny
I	brunatna	płynna	76,8	145,9	1,161	0	$C_{23}H_{48}O_2$	384,5	384
II	brunatna	gęstomazista	97,6	110,0	1,962	0	$C_{35}H_{66}O_2$	510,0	518
III	brunatna	krystaliczna	76,0	157,3	1,061	0	$C_{23}H_{44}O_2$	356,6	352
IV	ciemno-brunatna	płynna	100,3	—	—	142,47	$C_{23}H_{45}O_2$	331,1	338

nym przez Gubariewa i Wakulenka w 1945 r. z benzenowego ekstraktu maczugowców błonicy.

Cała frakcja *G* jest czystym mikrozydem: jest to eter trehalozy z wyższymi oksykwasami tłuszczowymi. Po acetylowaniu w temperaturze 80° zmydlonej frakcji *G* i po ekstrakcji octanu chloroformem, octan trehalozy wykrystalizował w postaci cienkich igiełek ułożonych w formie gwiazdek. Temperatura topnienia 75°.

Część lipidowa frakcji składa się z podfrakcji kwasów tłuszczowych i substancji niezmydlalnej; właściwości ich przedstawia tabela VII.

Tabela VII

	Barwa	Konsystencja	Temperatura topnienia	Liczba jodowa	Liczba neutralizacji	Liczba acetylowa	% grup acetylowych	Ciężar cząsteczkowy
Kwas tłuszczowy	kremowa	bezpostaciowy proszek	70	16,06	113,4	105,3	2,9	493,8
Substancja niezmydlona	bezbarwna	bezpostaciowy proszek	55—58,5	6,24	77,99	206,3	6,27	71,8

Ponadto wydzielono kwas arachinowy oraz kwasy tłuszczowe o wzorach: $C_{33}H_{60}O_3$, $C_{33}H_{64}O_3$, $C_{33}H_{66}O_3$, $C_{36}H_{72}O_3$ i $C_{50}H_{100}O_2$ (Kauczuk).

Kwapiński (1955/56) wyizolował następujące frakcje lipidowe szczepu *PW*$_8$ maczugowców błonicy:

a) lipidy wolne, wyekstrahowane: alkoholem i eterem, benzolem, acetonem, olejem parafinowym i chloroformem;

b) lipidy związane wyekstrahowane alkoholem i eterem z 1-procentowym HCl.

Z maczugowców rzekomo-błoniczych (Hofmanna) otrzymano dwie frakcje tłuszczów: lipidy wolne, wyekstrahowane alkoholem i eterem, i lipidy związane, wyekstrahowane alkoholem i eterem + 1-procen-

towy HCl. Poszczególne frakcje tłuszczowe miały konsystencję wosku lub smaru, barwę brunatną, zawierały 0,35-0,4% azotu i 0.54-0.62% fosforu.

Metodą chromatografii bibułowej według Spiteriego, zmodyfikowaną przez Pokornego, oddzielono we frakcjach „wolnych" lipidów następujące kwasy tłuszczowe: a) w maczugowcach błonicy: kwas palmitynowy, stearynowy oraz dwa kwasy tłuszczowe o krótszym łańcuchu, b) w maczugowcach rzekomo-błoniczych: kwas palmitynowy, stearynowy oraz oleinowy lub palmitooleinowy.

Lipidy „związane" maczugowców błonicy składają się z fosfatydu, frakcji rozpuszczalnej w acetonie i w eterze.

Lipidom „związanym" poświęcili szereg badań: Gubariew, Gawriłowicz i Sztulbaum (1952), Kwapiński (1956).

Gubariew i współpracownicy po usunięciu wolnych lipidów przez ekstrakcję acetonową wyosobnili „związane" lipidy w mieszaninie alkoholu i eteru, zawierającej 1-procentowy HCl. Wyciąg zobojętniono 5-procentowym alkoholowym roztworem NaOH, a rozpuszczalnik odpędzono w łaźni strumieniem CO_2. Wydajność związanych lipidów wynosiła 0,87% w stosunku do masy maczugowców.

Frakcja związanych lipidów miała postać ciemno zabarwionej substancji o konstystencji kleju. Jakościowymi próbami chemicznymi wykryto azot, fosfor i siarkę. Odczyny na sterydy (według Hager-Salkowskiego i Whiby) były ujemne. Nie stwierdzono obecności fosfatydów, wykryto natomiast substancje o charakterze węglowodanowym.

Lipidy związane zawierały 66.6% wolnych kwasów tłuszczowych, o przeciętnym ciężarze cząsteczkowym 472.

Według innych badań, fosfatydy tworzące część związanych lipidów maczugowców błonicy zawierały kwas stearynowy i prawdopodobnie kwas heksadecenowy. Z frakcji rozpuszczalnej w acetonie wyizolowano kwas palmitynowy oraz kwasy o łańcuchach zawierających około 32 atomów węgla, prawdopodobnie identyczne z kwasem korynomykolowym. Frakcja rozpuszczalna w eterze okazała się sympleksem białka i wysokocząsteczkowych kwasów tłuszczowych.

Stosując metodę chromatografii bibułowej Kwapiński (1956) wyróżnił z frakcji związanych kwasów tłuszczowych kwas palmitynowy i stearynowy.

3. CUKRY

Maczugowce błonicy i inne gatunki *Corynebacterium* odznaczają się małą zawartością węglowodanów (Wong i T'ung, 1939): *C. diphtheriae* około 5—7%, *C. xerose* 1—2%, *C. hofmannii* 1—2% suchej masy.

Wydajność frakcji cukrowych otrzymanych przez Orłową była jednak wyższa (11%); w moich doświadczeniach wynosiła około 9%.

Cukry w komórkach maczugowców mieszczą się głównie w błonie komórkowej i są silnie związane z białkiem (Holdsworth 1951, 1952, Kwapiński 1956). Pewna ilość cukrów znajduje się również w frakcjach lipidowych oraz kwasach nukleinowych (głównie ryboza).

Cukry związane w kompleksach z białkiem przechodzą do ekstraktów otrzymywanych przy użyciu roztworów ługów, zwłaszcza mniej stężonych (do 1%). Część cukrów udaje się oddzielić od białka podczas oczyszczania frakcji, a następnie wytrącić etanolem. Część jednak pozostaje nadal ściśle związana z cząsteczką białka.

Holdsworth (1951) podkreśla, że jedyną metodą umożliwiającą ilościowe wyosobnienie cukrów z maczugowców błonicy szczepu PW_8 jest ekstrahowanie nierozpuszczalnego kompleksu wielocukrowo-białkowego wrzącym wodnym roztworem kwasu pikrynowego. Otrzymany w ten sposób wielocukier po oczyszczeniu miał ciężar cząsteczkowy 800-900 i dawał po hydrolizie 24% cukrów redukujących. Posługując się jakościową próbą orcynolową Bendix (1901) stwierdził obecność pentoz w maczugowcach błonicy. Tamura (1914) wykrył arabinozę i mannozę.

W skład wielocukru wydzielonego przez Holdswortha (1951) wchodziły następujące cukry proste: 3 reszty d-arabinozy, 2 reszty galaktozy i 1 reszta d-mannozy.

W naszych frakcjach cukrowych szczepu PW_8 otrzymanych przez autora (Kwapiński 1956) wykryto metodą chromatografii bibułowej następujące cukry proste: glikozaminę, glikozę i galaktozę (lub oba te cukry razem), mannozę i arabinozę; poza tym znaleziono kwas uronowy. W frakcjach cukrowych maczugowców rzekomo-błoniczych występowała glikozamina, glikoza i galaktoza, mannoza, arabinoza, ryboza i ramnoza. Poszczególne frakcje cukrowe zawierały różne cukry, co wskazuje na możliwość występowania kilku odrębnych wielocukrów w maczugowcach.

Frakcje cukrowe maczugowców błonicy zawierają 1,5-100% substancji redukujących, 0-5,6% glikozaminy, 0-4,44% azotu i 0-0,22% fosforu. W frakcjach cukrowych maczugowców rzekomo-błoniczych znaleziono 0,7-12% substancji redukujących, 8,1-8,6% glikozaminy i 0,18-0,42% azotu.

Szereg frakcji cukrowych z maczugowców błonicy uzyskali Carlson i Hahre (1947, 1949), Orłowa (1953) oraz wymieniani już Wong i T'Ung, Gubariew i współpracownicy. Z odtłuszczonych maczugowców błonicy oraz z *C. xerose* i *C. hofmannii* uzyskali oni dwie frakcje cukrowe: jedną po ekstrakcji 1-procentowym kwasem octowym

i wytrąceniu 3 objętościami 95-procentowego etanolu z dodatkiem octanu sodowego, drugą po oddzieleniu frakcji proteidowej wyekstrahowanej 0,05 n NaOH z płynu znad osadu wytrącono etanolem w obecności octanu sodowego. Wydajność była mała. Zawartość azotu ogólnego wynosiła 3,1%; szczegółowych badań chemicznych nie wykonano.

Gubariew (1941) hydrolizował frakcję węglowodanową maczugowców błonicy w 6-procentowym kwasie siarkowym. Kwas siarkowy usunął węglanem baru, przesącz zagęścił w próżni w temperaturze 40-50° do 10 ml, po czym równą objętością etanolu wytrącił osad. Zdaniem Gubariewa, osad ten był aldobionianem baru. Związek ten nie wykazywał właściwości redukujących; po 4-godzinnej hydrolizie 25-procentowym kwasem siarkowym otrzymano natomiast 50% substancji redukujących. Obecność soli kwasu aldobionowego w maczugowcach nie została jednak potwierdzona w pracach Orłowej (1953).

W wielocukrze uzyskanym przez Gubariewa (1942) ze szczepu PW_8 po hydrolizie z 40-procentowym NaOH w 100°, wykryto galaktozę oraz chondrozaminę i d-arabinozę.

Orłowa (1950) posługując się metodą Gubariewa wyosobniła cukrowce z 1000 g suchej masy szczepu PW_8. Po dwukrotnej hydrolizie w 2 litrach 40-procentowego ługu sodowego na gorąco hydrolizat zobojętniała i wytrącała cukrowce etanolem. Wyosobnione węglowodany poddano frakcjonowaniu. Otrzymane frakcje cukrowe przemywała etanolem i eterem i suszyła w eksykatorze próżniowym. Jednorodność frakcji badała rozpuszczając część poszczególnych frakcji w wodzie i wytrącając je różnym stężeniem etanolu. Wyniki zestawiono w tabeli VIII.

Tabela VIII

Frakcje	Stężenie procentowe alkoholu użytego do wytrącania	Skręcalność (*d*) przed hydrolizą	% substancji redukujących po hydrolizie	Skręcalność (*d*) po hydrolizie
2	33 - 50	66°	83,5	3,4°
	50 - 60	80°	94,5	8,0°
	60 - 70	80°	89,0	10,0°
	70 - 75	56°	77,0	3,6°
3	60 - 75	58°	73,0	—25°
	75 - 80	72°	95,5	—42°
	80 - 83	70°	98,0	—44°
	83 - 86	72°	90,5	—43°
	86 - 87,5	72°	95,5	—48°
	87,5 - 90	72°	96,5	—43
	90 - 94	72°	98,0	—46°

Okazało się, że frakcja 2 w odróżnieniu od frakcji 3 jest niejednorodna. Właściwości tych frakcji przedstawia tabela IX.

Tabela IX

Frakcje	Właściwości fizyczne	Sole	N	P	Pentozy	Skręcalność 1-procentowego roztworu (rurka 4 dm)	Cukry proste
		w procentach					
2	biała, bezpostaciowa, rozpuszczalna w wodzie, nierozpuszczalna w rozpuszczalnikach organicznych, dializująca	0,8	0,46	0,25	4,2	+ 69	mannoza
3	biała, bezpostaciowa, rozpuszczalna w wodzie, nierozpuszczalna w rozpuszczalnikach organicznych, dializująca	4,4	0,23	0,12	5,0	+ 62	20% galaktozy, 22% mannozy, 58% arabinozy

Obie frakcje nie zawierały skrobi, białka, fruktozy ani grup acetylenowych.

Orłowa wyizolowała później (1953) trzy dalsze frakcje cukrowe. Pierwszą frakcję wytrącono odczynnikiem Fehlinga z odtłuszczonych maczugowców błonicy hydrolizowanych w 40-procentowym NaOH. Frakcję cukrową uwolniono od miedzi wytrącając ją kilkakrotnie z kwaśnego roztworu przy pomocy etanolu. Po przemyciu eterem i etanolem otrzymano biały, niehygroskopijny proszek (wydajność 400-500 mg z 100 g suchej masy bakterii). Skręcalność 1-procentowego roztworu frakcji: +84° (długość rurki 0,5 dm). Cukrowiec ten składał się z d-arabinozy, d-galaktozy i d-mannozy. Łańcuch cząsteczki tego galaktomannanoarabanu zawierał 15 cząsteczek pentoz i 10 reszt heksoz. Dalsze badania Orłowej nad strukturą wielocukrowców przy użyciu nadjodanu wykazały, że galaktomannanoaraban posiadał wiązania typu amylowego.

Drugą frakcję mannozanową otrzymano metodą antyforminową Riachiny. Był to biały, niehygroskopijny proszek o kącie skręcalności optycznej +82° (długość rurki 0,5 dm).

Z masy bakteryjnej pozostałej po obróbce antyforminowej uzyskano trzecią frakcję cukrową po 2-godzinnej hydrolizie 40-procentowym NaOH i wytrąceniu potrójną objętością alkoholu. Osad rozpuszczono w wodzie i ogrzewano w 150 ml odczynnika Fehlinga. Osad oczyszczono podobnie jak frakcję pierwszą. Frakcja ta w stanie suchym miała postać białej, niehygroskopijnej substancji o skręcalności +86°. Pod względem chemicznym był to również mannozan.

Wszystkie trzy preparaty mannozanu maczugowców błonicy wykazały praktycznie jednakowe właściwości. Były one wysoce odporne na

działanie tak silnych odczynników, jak 40-procentowy NaOH i antyformina. Zdolność wypadania mannozanu z wodnych roztworów pod wpływem odczynnika Fehlinga zanikała dopiero po dwugodzinnej hydrolizie. Mannozan trudno podlegał acetylacji i tylko w wyższej temperaturze. Ilość grup acetylenowych wynosiła 59,7%. Ciężar cząsteczkowy mannozanu wynosił 4 700. Wielocukier ten był zbudowany z 29 resztek mannozy, na każdą z nich przy acetylowaniu przypadało 2,7 reszt kwasu octowego (teoretycznie 3 reszty). Struktura cząsteczki była rozgałęziona.

Cukry znajdujące się w kompleksie białkowo-węglowodanowym pochodzącym prawdopodobnie z błony komórkowej maczugowców błonicy zbadał Holdsworth (1951, 1952).

Komórki maczugowców rozbijano przez wytrząsanie ich z perełkami szklanymi oraz wielokrotne zamrażanie i odtajanie zawiesiny w 2-procentowym roztworze octanu sodu. Pozostałość rozbitych komórek po przemyciu kilkakrotnie ekstrahowano 90-procentowym fenolem. Materiał nierozpuszczalny w fenolu przepłukiwano alkoholem i eterem w celu uwolnienia od fenolu. Otrzymana substancja, będąca prawdopodobnie budulcem błony komórkowej, nie poddawała się ekstrakcji formamidem, glykolem dietylenowym, pirydyną, mocznikiem, 10-procentowym kwasem octowym na gorąco, ani nie ulegała trawiącemu działaniu pepsyny i trypsyny. Kompleks ten zawierał 60% białka i 25% węglowodanów.

Właściwości chemiczne poszczególnych frakcji wydzielonych przez Holdswortha przedstawiono w tabeli X.

Tabela X

Frakcja	Zawartość w całych komórkach	Azot całkowity	Cukry redukujące	Pentozy	Glikozamina	Popiół
	w procentach					
Materiał śródkomórkowy	43,0	13,7	2,8	2,0	—	—
Resztki komórkowe	57,0	10,2	24,9	9,7	3,5	—
Frakcja rozpuszczalna w fenolu	12,0	13,5	2,0	1,6	—	—
Francja nierozpuszczalna w fenolu	46,0	9,5	25,4	9,8	4,1	10,1

Po hydrolizie poszczególnych frakcji stwierdzono, że węglowodany: śródkomórkowy i frakcji rozpuszczalnej w fenolu składają się z rybozy i śladów dezoksyrybozy; cukry te pochodzą prawdopodobnie z nukleo-

proteidów. W błonie komórkowej znajduje się wielocukrowiec zbudowany z 2 cząsteczek d-galaktozy, 1 cząsteczki d-mannozy i z 3 cząsteczek d-arabinozy. Poza tym zawiera on glikozaminę i chondrozaminę. Galaktoza zajmuje w łańcuchu cukrowca pozycję krańcową, gdyż utlenienie nadjodanem rozbija jej cząsteczki.

Wielocukier błony komórkowej maczugowców błonicy, oddzielony od białka działaniem kwasu pikrynowego na gorąco i oczyszczony, zawierał 1,9% popiołu, 0,3% fosforanu i 0,2% azotu; skręcalność (2-procentowy roztwór wielocukru) α $D^{20} = +109°$, ciężar cząsteczkowy 990.

Bardzo interesujące doświadczenia wykonali Carlson, Hahre i Neill (1947), którzy stwierdzili, że *C. diphtheriae* syntetyzuje z glikozo-1-fosforanu substancję podobną do skrobi. Posługując się metodą Schocka, używaną do frakcjonowania skrobi roślinnej, badacze ci uzyskali 2 frakcje wielocukrowe maczugowców błonicy. Frakcja *A* była krystaliczną substancją, podobną do amylozy, prawie nierozpuszczalną w zimnej wodzie a rozpuszczalną w zimnym 1N NaOH. Frakcja *B* była bezpostaciowym proszkiem, częściowo rozpuszczalnym w zimnej wodzie, o silnej skręcalności optycznej, o właściwościach podobnych do amylopektyny.

Cukry w frakcjach lipidowych znajdują się w związkach eterowych z wyższymi (C_{19}—C_{38}) kwasami tłuszczowymi. Dla związków tych Gubariew zaproponował nazwę mikrozydy. Z powodu małej ilości cukrów występujących w mikrozydach tylko w niektórych wypadkach udało się je zidentyfikować. Są to pentozy, choć nie wyłączona jest obecność heksoz połączonych z pentozami.

Obecność trehalozy stwierdzono w frakcjach lipidowych ekstraktu benzolowego oraz w ekstrakcie chloroformowym maczugowców błonicy. Po acetylowaniu w temperaturze 80° zmydlonej frakcji lipidowej i po ekstrakcji octanu chloroformem, octan trehalozy wykrystalizował w postaci cienkich igiełek ułożonych w formie gwiazdek. W podobny sposób kryształki octanu trehalozy uzyskano z lipidów wyekstrahowanych chloroformem.

Cukry wyosobnione z fosfatydów stanowiły substancje bezpostaciowe, barwy białej, łatwo rozpuszczalne w wodzie. Dawały dodatni odczyn Molischa.

4. SUBSTANCJE BIAŁKOWE

Wong i T'Ung (1939-1940) przygotowali szereg preparatów proteidowych, względnie nukleoproteidowych z maczugowców błonicy, między innymi ze szczepu *PW*$_8$. Odtłuszczone komórki ekstrahowano ługiem sodowym lub potasowym.

Uzyskane preparaty proteinowe ulegały wytrąceniu pod wpływem soli obojętnych, na przykład siarczanu amonowego, sodowego, pod działaniem soli metali ciężkich jak siarczanu miedzi lub octanu ołowiu, pod działaniem kwasu trójchlorooctowego i garbników. Odczyn Molischa w rozcieńczeniu preparatów białkowych 1 : 500 był we wszystkich przypadkach ujemny.

Białko rozpuszczalne w ługu było ciepłochwiejne i jego biologiczna swoistość typowa ulegała zniszczeniu po ogrzewaniu w temperaturze 56° przez 30 minut; białko uzyskiwało wówczas swoistość grupową.

Biełozierski, Korczagin i Smirnow (1955) otrzymali nukleoproteidy ekstrahując maczugowce błonicy 0,2-procentowym NaOH i zakwaszając wyciąg kwasem octowym do punktu izoelektrycznego. Nukleoproteidy stanowiły 79,37-86,25% suchej wagi maczugowców. Zawierały one około 1,45-2,19% fosforu, 4,19-5,74% pentoz.

Kwapiński (1956) otrzymał frakcje proteidowe lub nukleoproteidowe szczepu PW_8 z 470 g suchej masy bakterii według schematu podanego w cytowanej pracy. Poszczególne frakcje proteidowe uzyskano po ekstrakcji ługiem sodowym w stopniowo zwiększonym stężeniu (0,05 n-15%) i po wytrąceniu 10-procentowym kwasem octowym w punkcie izoelektrycznym (*pH* około 4-4,5). Ogółem otrzymano 9 frakcji proteidowych. Były to substancje bezpostaciowe, o barwie od białej do bladobrunatnej, rozpuszczalne w rozcieńczonych ługach.

W podobny sposób frakcjonowano komórki szczepu maczugowców rzekomo-błoniczych (Hofmanna) *Nr 124*, otrzymując 3 frakcje nukleoproteinowe. Miały one wygląd bezpostaciowych proszków, białych lub bladokremowych. Były rozpuszczalne w rozcieńczonych ługach. Poziom azotu we frakcjach proteidowych maczugowców błonicy wynosił od 1,28% w frakcji N_8 do 13,65% w frakcji N_1; poziom białka od 3,5 do 99,5%, fosforu od 0,22 do 1,93%. Frakcje proteidowe maczugowców rzekomo-błoniczych zawierały: 0,47-2,26% azotu, 6,5-51% białka i 0,0-0,12% fosforu.

Skład aminokwasowy substancji białkowych maczugowców błonicy badał już w 1914 r. Tamura, a następnie Work (1949) i Kwapiński (1956).

Po hydrolizie substancji białkowych maczugowców błonicy (hodowanych na wyciągu z nerek z peptonem) Tamura wykrył następujące aminokwasy:

leucyna	4,8%	suchej masy,
arginina	4,25%	„ „
lizyna	3,34%	„ „
walina	2,40%	„ „

tyrozyna 3,40% „ „ ,
histydyna 0,48% „ „ ,
izoleucyna, d- i l-prolina oraz tryptofan.

Cysteinę lub cystynę (1,91%) wykryto w frakcjach maczugowców po ekstrakcji 1,0-5,0-procentowym ługiem i wytrącaniu kwasem octowym.

W badaniach autora wykryto w maczugowcach błonicy i w maczugowcach rzekomo-błoniczych następujące aminokwasy: cystynę, histydynę, lizynę, glicynę, serynę, treoninę, kwas glutaminowy, cysteinę, walinę, fenyloalaninę oraz leucynę.

Swoisty $\alpha\varepsilon$-aminokwas obojętny — kwas dwuaminopimelinowy w maczugowcach błonicy wykryła Work (1949) posługując się chromatografią bibułową. Ten $\alpha\varepsilon$-aminokwas występował na chromatogramie w pozycji niemal identycznej z pozycją kwasu etanoloamino-O-fosforowego i cystyny. Przy pomocy adsorpcji surowych hydrolizatów maczugowców na kolumnach chromatograficznych i elektrodializy eluatów amonowych udało się wyizolować kwas dwuaminopimelinowy. Uzyskany w formie krystalicznej miał on postać białych igieł, o punkcie topnienia 305°; był łatwo rozpuszczalny w ciepłej wodzie, w rozcieńczonych kwasach i w alkoholu, umiarkowanie rozpuszczalny w organicznych rozpuszczalnikach. Sól barowa tego kwasu była nierozpuszczalna w 50-procentowym alkoholu.

Na podstawie elementarnej analizy ustalono wzór empiryczny $C_7H_{14}N_2O_4$. Metodą ninhydrynową analizy Van Slyke'a wykazano, że cały azot znajduje się w formie α-aminowej. Pochodna benzoinowa otrzymanego aminokwasu wykazywała właściwości podobne do autentycznego kwasu $\alpha\varepsilon$-dwubenzaminodipimelinowego:

$$\begin{array}{c} NH_2 \qquad\qquad NH_2 \\ | \qquad\qquad\quad | \\ HOOC{-}CH{-}(CH_2)_3{-}CH\cdot COOH \end{array}$$

Na uwagę zasługuje fakt wyizolowania takiego samego aminokwasu z prątków gruźlicy.

Kwas dwuaminopimelinowy znajduje się w błonie komórkowej maczugowców błonicy, a tylko ślady jego można znaleźć w białkach śródkomórkowych (Holdsworth 1952).

Polinukleotydy w komórkach maczugowców błonicy występują w 2 postaciach: 1) związanej z białkiem, 2) wolnej od białka (Bielozierski, Korczagin, Smirnow 1955). Są to pentozonukleotydy typu drożdżowego.

Ilość polinukleotydów związanych z białkiem utrzymuje się na stałym poziomie przez cały cykl życiowy maczugowców. Zawartość polinukleotydów wolnych spada natomiast w miarę starzenia się hodowli.

Spadek poziomu kwasów nukleinowych i fosforu nukleinowego jest bardzo wyraźny: (tabela XI).

Spadkowi poziomu kwasów nukleinowych towarzyszy znikanie ziarn wolutyny. Ziarna wolutyny znikają również po ekstrakcji maczugowców błonicy słabym ługiem.

Tabela XI

Wiek hodowli	Kwasy nukleinowe % suchej masy obliczony w ilości		Fosfor %
	fosforu	puryn	
1 doba	15,96	—	1,55
2 dni	12,36	13,22	1,20
6 dni	4,63	4,92	0,45
10 dni	3,91	4,19	0,38

W uzyskanych przeze mnie frakcjach nukleoproteidowych maczugowców błonicy poziom rybozy wynosił od 0,4 do 4,08% suchej masy: w frakcjach maczugowców rzekomo-błoniczych 0,96-5,0%. Dezoksyrybоza występowała jedynie w ilościach śladowych. Również Holdsworth (1952) znalazł tylko ślad dezoksyrybozy w maczugowcach błonicy.

Nukleotydy maczugowców błonicy zawierają zasady purynowe: adeninę i guaninę oraz zasady pirymidynowe: tyminę, uracyl i cytozynę. Nie zawierają metylocytozyny.

Z doświadczeń Biełozierskiego i współpracowników, Holdswortha i moich wynikałoby, że kwas nukleinowy maczugowców ma charakter głównie kwasu rybozonukleinowego, albo jest to kwas nukleinowy nowego, swoistego typu.

5. TOKSYNA MACZUGOWCÓW BŁONICY

Toksyna błonicza jest produktem przemiany materii maczugowców błonicy, powstającym przy ich autolizie. Produkt ten pod wpływem enzymów maczugowców jest wytwarzany w komórkach bakterii i wydzielany na zewnątrz albo *in vivo*, albo jest wytwarzany *in vitro* ze składników podłoża zmienionych pod wpływem enzymów wydzielanych do pożywki przez maczugowce „toksygenne".

Doświadczenie Saissaca i Raynauda (1951) wskazują wprawdzie na fermentatywną wewnątrzkomórkową syntezę toksyny, lecz dodanie proteolitycznych enzymów do hodowli maczugowców wywoływało zwiększenie zawartości toksyny. Raynaud, Turpin i współprawni-

cy (1954) wykazali związek między wytwarzaniem toksyny i wzrostem maczugowców.

Za tym, że toksyna błonicza powstaje pod wpływem pozakomórkowych enzymów proteolitycznych przemawiają doświadczenia Derubyego i Walbuma (1923).

Wydaje się, że w wytwarzaniu toksyny błoniczej czynny udział biorą zarówno wewnątrz- jak i pozakomórkowe enzymy. Świadczą o tym badania Smirnowej (1955). Stwierdziła ona mianowicie przy braku toksyny w hodowli maczugowców jednocześnie bardzo niską aktywność proteaz. W przewietrzanych hodowlach powstawały małe ilości toksyny, a aktywność wewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych była niska. Pozakomórkowe proteazy nie powstawały w tych warunkach w ogóle. W hodowli głębinowej stwierdzono wyższą aktywność zewnątrz- i pozakomórkowych proteaz oraz większe ilości toksyny.

Wykazano, że istnieje wyraźny związek między składem pożywki i przemianą materii a wytwarzaniem toksyny błoniczej (Hottinger 1933). Toksyna błonicza, jak się wydaje, obok swoistej substancji „toksycznej" zawsze zawiera pewien odsetek substancji będących składnikami protoplazmy maczugowca.

Opisano wiele metod wyosobniania toksyny (lub toksoidu) błoniczej z pożywki, np. wytrącenie kwasem przy *pH* 3,8-4,2, frakcjonowanie siarczanem amonu, frakcjonowanie metanolem w buforze octanowym *pH* 4,0-5,0 w niskiej temperaturze (—5 do —20°). Wytrąconą toksynę lub toksoid następnie oczyszczano.

Oczyszczona toksyna błonicza daje wszystkie odczyny białkowe, koaguluje w *pH* 4,0; zawiera 16% azotu i 0,75% siarki; nie zawiera proteaz, peptonów, węglowodanów i barwików. Posiada 2/3 wolnych grup aminowych. Po jej hydrolizie otrzymano mieszaninę aminokwasów: tyrozyny — 9%, lizyny — 5,3%, argininy — 3,8%, histydyny — 2,3%, tryptofanu — 1,14%. Ciężar cząsteczkowy jest niewysoki: 18 000-72 000. Toksyna jako substancja białkowa o charakterze globuliny ulega rozkładowi pod wpływem enzymów proteolitycznych. Pod działaniem formaldehydu wolne grupy aminowe toksyny zostają związane z cząsteczką formaldehydu według wzoru:

$$—NH_2 + O=CH_2— \rightleftarrows —N—CH_2 + H_2O$$

Powstaje w ten sposób toksoid. Toksoid powstaje również pod wpływem 6-dniowego działania 1,0 M KSCN przy *pH* 8, w temperaturze 37° (Hosoya i Yokohama 1953). Toksoid błoniczy posiada chemiczne właściwości podobne do toksyny błoniczej. W toksoidzie surowym (a w niskim stężeniu także w chemicznie oczyszczonym) znajduje się frakcja *P*, składająca się z nietoksycznych białek, zawierająca 0,03%

toksoidu czystego (Lawrence i Pappenheimer 1948). Wysoce oczyszczony toksoid błoniczy zawiera 5% frakcji *P*. Oczyszczony toksoid i frakcja *P* są immunologicznie różne: frakcja *P* wywołuje przypuszczalnie niepożądane reakcje poszczepienne u osobników wrażliwych (Lawrence i Pappenheimer). Istnieją podstawy do przypuszczeń, że frakcja *P* jest składnikiem protoplazmy maczugowców.

Pillemer, Toll i Badger (1947) uzyskali 5 frakcji toksoidu o coraz większym stopniu czystości, frakcjonując toksoid w buforze octanowym o *pH* zmienianym od 4,0 do 5.4, metanolem o stężeniu końcowym 40-25%, przy temperaturze 3-5°.

Końcowa frakcja (*PV*), barwy bladożółtej, zawierała 16,6% azotu, dawała silne odczyny na tyrozynę i argininę, słabszy na tryptofan; nie zawierała fosforu, siarki, żelaza i kobaltu. Skręcalność $(\alpha)D^{25}$-45°, punkt izoelektryczny 4,7±0,1; Lf/mg N 2190.

BUDOWA ANTYGENOWA MACZUGOWCÓW BŁONICY

Badania nad antygenami maczugowców można podzielić na dwie grupy:

1) badania antygenów przy użyciu metod serologicznych z uwzględnieniem fizycznych właściwości antygenów,

2) badania immunologicznych właściwości składników chemicznych oddzielonych lub wyizolowanych z maczugowców przy użyciu metod chemicznych.

A. BADANIA SEROLOGICZNE CAŁYCH KOMÓREK

Do pierwszej grupy badań należą przeważnie prace starsze, chociaż w nowszym piśmiennictwie również znajdujemy liczne doświadczenia tego typu.

Posługiwanie się całymi komórkami maczugowców w odczynach serologicznych jest trudne i ma niekiedy wartość problematyczną z powodu znacznej skłonności do samoistnej aglutynacji w roztworze fizjologicznym i w surowicy. Już Nicolas (1896) i Langer (1916) opierając się na tej właściwości maczugowców podzielili je na 2 grupy: aglutynujące i nie aglutynujące. Samoistne wykłaczanie niektórych szczepów maczugowców jest też, przynajmniej częściowo, przyczyną niejednolitych wyników, otrzymanych przez różnych autorów w badaniach nad serologicznym zróżnicowaniem maczugowców metodą aglutynacji. Trwałą zawiesinę maczugowców można otrzymać przez zawieszenie ich w N 250 NaOH (Robinson, Peeney 1936) lub przez hodowanie ich w pożywce zawierającej tween 80 (Minzel, Freeman 1950).

Langer (1916) stwierdził identyczność antygenowego charakteru receptorów wszystkich szczepów *C. diphteriae*.

W następnych latach ogłoszono liczne prace, w których wyróżniono dwa lub więcej typów serologicznych maczugowców, przeważnie w oparciu o metodę aglutynacji krzyżowej i absorpcję surowic. Havens (1920) podzielił 206 badanych szczepów na 2 różne typy nie wykazujące aglutynacji krzyżowej. Podobne wyniki uzyskali Poxson i Redewitz (1922). Bell (1922) wyróżnił wśród 133 szczepów 3 różne typy serologiczne obejmujące 80% szczepów: 13% szczepów należało do I, 6% do II i 61% do III typu serologicznego. Durant (1918, 1921) podzielił 255 badanych przez siebie szczepów maczugowców na 5 typów serologicznych; Smith (1923) 89 szczepów na 7 typów, Bestand i Scott (1923), według Scott (1923) — 265 szczepów na 8 typów, Eagleton i Baxter (1923) — 323 szczepy na 10 typów serologicznych.

Przy pomocy metody aglutynacji wykazano pokrewieństwo antygenowe między maczugowcami błonicy a innymi gatunkami *Corynebacterium*. Reakcje krzyżowe występowały między szczepami niezjadliwych maczugowców błonicy, *C. hofmannii* i *C. xerose* (Bailey 1925). Szczep *P* otrzymany ze szczepu PW_8 przez Neilla, Fleminga i Gasperiego (1931) był aglutynowany przez surowice odpornościowe przeciw maczugowcom błonicy, przez surowicę przeciw *C. xerose* i przez liczne antytoksyczne surowice lecznicze.

Nie udało się też odróżnić serologicznie szczepów zjadliwych od niezjadliwych (Eagleton i Baxter 1923, Smith 1923, Scott 1923, Robinson i Peeney 1936). Poszczególne szczepy posiadają widocznie tę samą jakościowo strukturę, a różnią się tylko pod względem antygenowym ilościowo.

Niemal od momentu podziału maczugowców błonicy na grupy: *gravis*, *mitis* i *intermedius* na podstawie właściwości biochemicznych, hodowlanych i zjadliwości, starano się wyróżnić przy pomocy metod serologicznych wspomniane grupy. Próby te doprowadziły do dalszego serologicznego rozczłonkowania szczepów maczugowców błonicy. Wykazano, że szczepy *gravis*, *mitis* i *intermedius* można podzielić na typy serologiczne, w obrębie których występują jeszcze podtypy, przy czym klasyfikacja serologiczna nie zawsze pokrywa się z podziałem na grupy morfologiczne.

Orr-Ewing (1933) podzielił szczepy, głównie grupy *gravis*, na 5 typów serologicznych: typy *A*, *B*, *D* — obejmujące szczepy odpowiadające pod względem hodowlanym grupie *gravis*, typ *C* — szczepy o nietypowych właściwościach hodowlanych, typ 5 — szczepy nie podobne do grupy *gravis* pod względem hodowlanym. Podobne wyniki otrzymali Robinson i Peeney (1936), badając 739 szczepów pochodzących z różnych krajów. Wyodrębnione przez tych badaczy typy serologiczne

I i *II* obejmowały szczepy o cechach hodowlanych charakterystycznych dla grupy *gravis*; szczepy należące do typów serologicznych *III*, *IV* i *V* posiadały natomiast inne cechy hodowlane. Liczba szczepów zakwalifikowanych do poszczególnych typów była różna: typ *I* — 392, *II* — 286, *III* — 36, *IV* — 15, *V* — 10 szczepów.

Nishimoto (1936) wyróżnił 13 typów serologicznych. Antytoksyny otrzymane przy użyciu hodowli 7 typów serologicznych zobojętniały toksyny homologiczne oraz toksyny sześciu innych typów; maczugowce różniące się antygenowo wytwarzają zatem toksynę o grupach chwytnych jednakowych dla wszystkich antytoksyn.

Hewitt (1947) na podstawie prac różnych autorów i badań własnych wyróżnia w obrębie grupy *gravis* 13 typów, w grupie *intermedius* 4 typy i w grupie *mitis* 40 typów serologicznych. Poniżej podano podział zaproponowany przez tego autora:

Grupa *gravis*:

Typ *I* — odpowiada typowi *A* (Ewing) i typowi *I* (Robinson, Peeney); typ najczęściej spotykany w Anglii. Na 133 wyizolowane w tym kraju szczepy 112 należało do tego typu; są to szczepy hemolizujące lub niehemolizujące.

Typ *II* — odpowiada typowi *B* (Ewing) i typowi *II* (Robinson, Peeney), typ najczęściej spotykany na kontynencie europejskim (24 z 28 badanych szczepów grupy *gravis*); większość szczepów świeżo wyizolowanych silnie hemolizuje;

Typ *III* — typ *C* (Ewing) i typ *III* (Robinson, Peeney) występujący w Anglii tylko wyjątkowo (3 z 133 szczepów),

Typ *IV* — Typ *D* (Ewing) i typ *IV* (Robinson, Peeney) pochodzący prawie wyłącznie z Afryki,

Typ *V* — odpowiada typowi *V* (Robinson, Peeney), pochodzi prawie wyłącznie z Ameryki,

Typ *VI* — wykazuje podobieństwo do typu *III*, zjadliwy, niehemolizujący,

Typ *VII* — obejmuje pojedyncze zjadliwe szczepy wyhodowane w Austrii w 1946 r.,

Typ *VIII* — obejmuje niezjadliwe, hemolityczne szczepy, wyosobnione na Środkowym Wschodzie,

Typ *IX* — oryginalne szczepy wyhodowane w Warszawie i Brukseli, zjadliwe, niehemolizujące,

Typ *X* — obejmuje pojedyncze zjadliwe szczepy wyizolowane w Kopenhadze (Tarnowski 1942) i na Środkowym Wschodzie,

Typ *XI*, *XII*, *XIII* — rzadkie typy wyhodowane w Polsce i Skandynawii.

Grupa *intermedius*:

Typ	Antygeny
I a	*m*
I b	*m, n*
II a	*n*
II b	*n, o*

Typ *I* zawiera zjadliwe, niehemolityczne szczepy, występujące częściej w Anglii niż na kontynencie.

Typ *II* obejmuje szczepy zjadliwe, niehemolityczne, często spotykane w Anglii.

Grupa *mitis*:

Do tej grupy zaliczono wszystkie szczepy, które nie rozkładały skrobi, a pod względem morfologicznym i hodowlanym różniły się od grupy *intermedius*. Spośród 40 odróżnionych przez Hewitta serologicznych typów omówiono tylko 3 typy:

Typ *I* — obejmuje 22 szczepy silnie hemolizujące.

Typ *II* — obejmuje 11 szczepów (Londyn. Bruksela); aglutynują krzyżowo z typem *gravis*. Niehemolityczne.

Typ *III* — obejmuje 24 szczepy: 18 niezjadliwych, niehemolitycznych i 6 zjadliwych i hemolitycznych.

Z powyższego zestawienia wynika, że Hewitt najpierw przydzielił szczepy do jednej z trzech grup morfologicznych, a następnie w obrębie tych grup przeprowadził typowanie serologiczne.

Stwierdzono, że w danym środowisku występuje często jeden typ serologiczny; na przykład w pewnej rodzinie 13 członków było zakażonych tym samym typem serologicznym. Naturalnie w większym zbiorowisku chorych, na przykład na oddziale szpitalnym, skupiającym chorych z różnych stron, może występować kilka typów maczugowców.

Pod wpływem leczenia antybiotykami (penicyliną, gramicydyną), a także pod wpływem tych antybiotyków *in vitro* może nastąpić pewna zmiana właściwości antygenowych maczugowców. Tę zmienność obok zmienności biochemicznej i morfologicznej stwierdziła K u r a z i n a (1955).

W surowicy chorych na błonicę i rekonwalescentów, a także osób, które nabyły naturalną odporność przeciw błonicy bez zachorowania, wykryto aglutyniny grupowo swoiste (N e i l l i współpracownicy 1931) lub typowo swoiste. Typowo swoiste aglutyniny pojawiały się zwykle w trzecim tygodniu choroby, osiągając najwyższe miano w 4-5 tygodniu. W wypadku superinfekcji wykrywano aglutyniny zarówno przeciw szczepowi pierwotnemu, jak i nadkażającemu.

Antygen swoisty (powierzchniowo-somatyczny *K*) jak wynika z badań L a u t r o p a (1950), W o n g a i T' U n g a (1938—1940) oraz O e d i n g a (1949), jest ciepłochwiejny; antygen grupowo swoisty (somatyczny *O*) jest natomiast ciepłostały.

Lautrop (1950) wyróżnił wspomniane antygeny posługując się surowicami królików uodpornionych maczugowcami błonicy formalinowanymi lub zawieszonymi w N/50 NaOH i ogrzewanymi przez 2 godziny w 127° w autoklawie. W przygotowanych surowicach wykryto 2 rodzaje przeciwciał. Przeciwciała przeciw antygenowi ciepłostałemu można było wyabsorbować autoklawowaną zawiesiną maczugowców. Ciepłochwiejny antygen wstrzymywał reakcję z antygenem ciepłostałym w surowicy otrzymanej przez uodpornienie hodowlą autoklawowaną; hodowla formalinowana, zawierająca antygen ciepłochwiejny i ciepłostały nie aglutynowała w tej surowicy. Zawiesina autoklawowana, w której antygen ciepłochwiejny został zniszczony, ulegała natomiast silnej aglutynacji.

W obrębie antygenu *O* odróżniono następnie, badając 300 szczepów maczugowców błonicy, 2 odmienne typy, *1* i *2*. Większość szczepów zawiera wspólny antygen somatyczny *1*; szczepy *mitis* zawierają jednak antygen *2*.

Antygen *O* jest więc antygenem grupowym. Wykryty został również w komórkach *C. hofmannii* i *C. ovis*. Antygen *O* może być przyczyną krzyżowych reakcji serologicznych między różnymi grupami, gdyż zwykłe typowe surowice, przygotowane przez uodpornienie królików formalinowymi lub zabitymi ciepłem maczugowcami zawierają grupowe aglutyniny *O*; przejrzystsze wyniki uzyskuje się używając typowe surowice, z których usunięto przeciwciała grupowe.

Antygen *K*, zwany przez Oedinga *Ld*, związany jest z białkową frakcją maczugowców rozpuszczalną w zasadach. Antygen *O* znajduje się w frakcjach wielocukrowych (Wong i T'Ung 1939). Chemiczny charakter i budowa antygenów *O* i *K* nie zostały jednak dotychczas zbadane.

Zjadliwość maczugowców ani właściwość wytwarzanej przez nie toksyny nie są związane z różnicami serologicznymi. Serologicznie różne typy wytwarzają toksynę o takim samym stopniu toksyczności (Durand 1920, Havens 1920, Bell 1922, Mann 1922, Paxsen i Redewitz, 1922, Nishimoto 1936).

Badania immunologiczne wskazują więc na złożoną strukturę szczepów *Corynebacterium*. Charakteryzuje się ona: 1) różnicami immunologicznymi między poszczególnymi szczepami jednego gatunku, 2) wspólnością antygenów między szczepami różnych gatunków. Świadczą o tym również badania serologiczne wykonane z innymi, mniej znanymi gatunkami rodzaju *Corynebacterium*. Stwierdzono bliskie pokrewieństwo antygenowe między *C. avidum* i *C. anaerobium* oraz *C. parvum* i *C. liquefaciens*. Te cztery gatunki były antygenowo pokrewne gatunkowi *C. granulosum*. *C. diphteroides* natomiast ma odmienną budowę antygenową.

Antygenowe powinowactwo stwierdza się również w obrębie komórek dyfteroidów roślinnych i glebowych (*C. michiganense* i *C. insidiosum*). Rosenthal i Cox (1953) odróżnili antygeny somatyczne *A* i *B* oraz *C*. Dziewięć szczepów *C. michiganense* można było podzielić serologicznie na 2 grupy: 1) zawierające tylko antygen *B* (4 szczepy), 2) zawierające antygen *A* i *B* (5 szczepów). Do drugiej grupy zaliczono też pierwszy szczep *C. insidiosum*. Drugi szczep *C. insidiosum* zawierał natomiast antygen *B* oraz swoisty antygen *C*. Antygen *A* hamuje reakcje z antygenem *B* w odczynie aglutynacyjnym (u szczepów zawierających obydwa antygeny). Szereg szczepów zawierało substancję ciepłochwiejną, która hamowała reakcje z antygenem *A*.

Podziałowi maczugowców na typy serologiczne, opartemu na badaniach wykonywanych metodą aglutynacji, nie odpowiadają wyniki uzyskane przy pomocy metody wiązania dopełniacza. Odczyn wiązania dopełniacza z całymi komórkami maczugowców błonicy jako antygenem nie pozwala na wyraźne odróżnienie typów serologicznych (Kolmer 1912, Mansheim 1930). Wyniki wskazują natomiast na znaczne pokrewieństwo serologiczne wszystkich trzech grup morfologicznych, a zwłaszcza grup *gravis* i *intermedius* (Stone 1924, Mentona, Cooper i Fussel 1933, Oeding 1949).

Stone badała następujące antygeny maczugowców błonicy:

1A — 48-godzinna hodowla na podłożu Löfflera zawieszona w soli fizjologicznej inkubowana przez 4 dni w temperaturze 37°,

I B — płyn znad osadu odwirowanego antygenu *I A*,

I C — wytrącone maczugowce czterokrotnie przemyte.

Poza tym przygotowała kilka podobnych antygenów z hodowli 24-godzinnej i 48-godzinnej, przechowywanej następnie 4 dni w lodówce. Antygeny *I A* i *I B* silnie reagowały w odczynie wiązania dopełniacza, antygen *I C* był natomiast nieczynny.

Bull i Mc Kee (1924) przygotowali wyciągi z 5 zjadliwych szczepów, z 3 szczepów niezjadliwych maczugowców błonicy oraz z 3 szczepów rzekomo-błoniczych. Wyciągi 2 szczepów rzekomo-błoniczych reagowały z surowicą przeciw maczugowcom błonicy, a wyciąg 1 szczepu tylko z surowicą homologiczną. Żaden szczep maczugowców nie reagował z surowicami przeciw *C. pseudodiphtheriae*.

Przyczyną niepowodzeń przy stosowaniu odczynu wiązania dopełniacza jest często antykomplementarność „całkowitego" antygenu maczugowców. Trudność tę można ominąć przygotowując antygen według przepisu Oedinga (hodowla na 7-procentowym agarze z krwią ludzką, zawieszenie w soli fizjologicznej, inkubacja w temperaturze 56° przez 1 godzinę). W badaniach Oedinga miana wiązania dopełniacza z antygenami maczugowców błonicy były znacznie niższe (np. 1 : 384 ze szczepami

grupy *gravis*) niż w przypadku aglutynacji (1 : 10 240). Silniejsze okazały się natomiast reakcje krzyżowe między 12 szczepami należącymi do różnych grup morfologicznych. Doświadczenia Oedinga (1949) wskazują na bliższy związek antygenowy między szczepami grupy *gravis* i *intermedius* niż między *gravis* a *mitis* oraz *mitis* i *intermedius*. W odczynie wiązania dopełniacza biorą udział głównie antygeny wspólne dla całego gatunku.

Większość omówionych badań serologicznych wskazuje na obecność wspólnych składników antygenowych w różnych grupach a nawet gatunkach maczugowców.

B. BADANIA IMMUNOLOGICZNYCH WŁAŚCIWOŚCI WYOSOBNIONYCH FRAKCJI KOMÓRKOWYCH

1. ANTYGENY CUKROWE

Badania nad właściwościami antygenowymi frakcji cukrowych maczugowców błonicy wykonali: Wong i T'Ung (1938-1940), Kwapiński (1954-1956) a częściowo także Gubariew i współpracownicy (1941-1953) oraz Orłowa (1950).

Frakcje cukrowe uzyskane z różnych gatunków rodzaju *Corynebacterium* przez Wonga i T'Unga wykazały następujące właściwości antygenowe: większość surowic królików uodpornionych maczugowcami reagowała z homologicznym wielocukrowcem w mianie 1 : 100 000, wyjątkowo w przypadku szczepu PW_8 w mianie 1 : 250 000. Surowice przeciw maczugowcom grupy *gravis, mitis, intermedius* dawały się całkowicie absorbować homologicznym lub heterologicznym wielocukrowcem, a także wielocukrowcem niezjadliwego maczugowca. Wielocukrowce wyizolowane z *C. xerose* reagowały z surowicami przeciw maczugowcom błonicy wszystkich grup w rozcieńczeniu 1 : 100 000, a wielocukrowiec *C. hofmannii* reagował tylko słabo w rozcieńczeniu 1 : 1000 z tymi samymi surowicami. Cukrowce maczugowców błonicy, podobnie jak cukrowce *C. xerose*, reagowały z surowicami królików uodpornionych komórkami *C. xerose* w rozcieńczeniu 1 : 100 000. Surowica przeciw maczugowcom Hofmanna oddziaływała tylko z homologicznym wielocukrowcem w rozcieńczeniu 1 : 100 000, a nie reagowała z heterologicznymi cukrowcami. Badania te wskazują, że wielocukrowiec *C. hofmannii* jest antygenowo odmienny od cukrowców gatunkowo swoistych innych badanych gatunków maczugowców i dyfteroidów.

Frakcje cukrowe otrzymane przez Gubariewa i współpracowników oraz Orłową okazały się serologicznie nieaktywne. Przyczyną tego były zapewne zbyt drastyczne środki użyte w celu wyizolowania cukrowców.

Frakcje cukrowe wyekstrahowane ze szczepu PW_8 maczugowców błonicy przez K w a p i ń s k i e g o (1956) były na ogół aktywne w surowicy homologicznej, z wyjątkiem frakcji końcowej C_{10} i sympleksu *R*, wytrąconych z płynu po oddzieleniu końcowych frakcji proteidowych, ekstrahowanych 15-procentowym ługiem sodowym. Aktywność frakcji „zasadowych" była stosunkowo wysoka (miano 250 000-1 000 000); frakcje wyciągane kwasem octowym okazały się natomiast serologicznie mniej czynne, podobnie jak frakcje cukrowe otrzymane z fosfatydów. Z surowicą przeciw maczugowcom rzekomo-błoniczym reagowały głównie początkowe frakcje „zasadowe" w mianie stosunkowo niższym niż w surowicy homologicznej. Z surowicą antytoksyczną reagowały głównie trzy frakcje zasadowe oraz cukry wyizolowane z fosfatydów. Frakcje cukrowe maczugowców błonicy wyekstrahowane rozcieńczonym kwasem octowym okazały się zatem swoiste dla gatunku, podczas gdy inne frakcje cukrowe wykazywały szerszą swoistość rodzajową.

Antygeny cukrowe maczugowców błonicy wykazywały powinowactwo także w stosunku do przeciwciał znajdujących się w surowicy anty-*Mycobacterium tuberculosis* $H_{37}Rv$ (miano 1 : 64 000-1 000 000) (K w a p i ń s k i 1956 a). Ponieważ z drugiej strony frakcje cukrowe prątków gruźlicy $H_{37}Rv$ reagowały z surowicą anty-PW_8 (miano 1 : 32 000-125 000), można wnioskować o serologicznym, ponadrodzajowym pokrewieństwie składników węglowodanowych tych dwu drobnoustrojów.

Frakcje cukrowe maczugowców rzekomo-błoniczych okazały się nieco mniej aktywne niż odpowiednie antygeny PW_8 (miano 1 : 8000-250 000). Frakcje „kwaśne" wykazywały swoistość gatunkową, inne oddziaływały z surowicą anty-PW_8; w odróżnieniu natomiast od podobnych antygenów maczugowców błonicy nie reagowały z surowicami odpornościowymi dla prątków kwasoopornych. Były więc rodzajowoswoiste.

2. ANTYGENY BIAŁKOWE

Preparaty białkowe uzyskane przez W o n g a i T' U n g a (1939-1940) z 22 szczepów maczugowców błonicy dawały zwykłe reakcje barwne na białko (odczyny: biuretowy, ksantoproteinowy, Hopkins-Cole, Millona); ulegały wytrąceniu solami obojętnymi, np. siarczanem amonu, siarczanem sodu, solami ciężkich metali, np. siarczanem miedzi lub octanem ołowiu, oraz kwasem trójchlorooctowym i garbnikowym. Odczyn Molischa w rozcieńczeniu frakcji białkowych 1 : 500 był ujemny. Ekstrahowanie białek eterem nie niszczyło ich swoistości typowej, ale zmniejszało ich aktywność serologiczną, co wzkazuje, że frakcje proteinowe nie były kompleksem lipidowym.

Preparaty białkowe W o n g a i T' U n g a były na ogół typowoswo-

iste. Niektóre preparaty np. otrzymane ze szczepu PW_1 były ciepłochwiejne: pod wpływem ogrzewania w 56° przez 30 minut białko zmieniało się pod względem immunologicznym w gatunkowoswoiste. Ta konwersja odbywała się tym łatwiej, im czynniejszy serologicznie był dany preparat. Większość stanowiły praparaty proteinowe, które nie traciły swoistości typowej i aktywności serologicznej po ogrzewaniu w temperaturze 122° przez 20 minut. Białka przygotowane przy użyciu 1-procentowego KOH w gotującej łaźni wodnej były natomiast gatunkowoswoiste, o niskiej aktywności serologicznej. W ogóle serologiczna aktywność preparatów białkowych zależała jak zwykle w dużym stopniu od sposobu ich izolowania: działanie bardziej stężonymi roztworami ługu, zwłaszcza przy ogrzewaniu, powodowało denaturację różnego stopnia. Zaznaczały się różnice ilościowe aktywności serologicznej protein wyizolowanych z poszczególnych szczepów maczugowców: niektóre oddziaływały w rozcieńczeniu 1 : 100 000, inne tylko w 1 : 5 000. Jak wspomniano, antygeny białkowe na ogół były typowoswoiste, jednak po wyabsorbowaniu nierozcieńczonych surowic typowoswoistych szczepami 2, 6 i 7 miano ich w stosunku do antygenów homologicznych ulegało około 10-krotnemu obniżeniu. Zjawisko to może tłumaczyć reakcje krzyżowe obserwowane w odczynie aglutynacyjnym komórek tych szczepów maczugowców.

Aktywność frakcji nukleoproteinowych maczugowców błonicy PW_1, otrzymanych według metody własnej (K w a p i ń s k i 1956), wahała się również w szerokich granicach (miano 1 : 4000-250 000), zależnie od stężenia ługu użytego do ekstrakcji.

Niektóre składniki antygenowe maczugowców błonicy i toksyny błoniczej wykazują serologiczne pokrewieństwo. S p a n e d d a (1937) wykazał, że surowice królików uodpornionych różnymi szczepami maczugowców reagują z przesączem hodowli szczepów homologicznych. P i l l e m e r, T o l l i B a d g e r (1947) stwierdzili precypitację frakcji *PV* oczyszczonej toksyny w surowicy odpornościowej przeciwmaczugowcowej. W naszych badaniach (K w a p i ń s k i 1956) wykazano, że trzy frakcje nukleoproteinowe maczugowców PW_8 reagowały z surowicą antytoksyczną. F u k s (1954) przy pomocy odczynu precypitacyjnego badał obecność białka drobnoustrojowego w 30 różnych seriach anatoksyny. Stwierdził, że wszystkie zawierały białko maczugowców błonicy (miano precypitacyjne 1 : 120-1 : 240).

Frakcje nukleoproteinowe maczugowców błonicy są serologicznie spokrewnione z podobnymi frakcjami maczugowców rzekomo-błoniczych i prątków kwasoopornych (K w a p i ń s k i 1956a).

Z surowicą przeciw maczugowcom rzekomo-błoniczym reagowały głównie początkowe frakcje nukleoproteinowe, w mianie dwu- do czterokrotnie niższym niż z antygenami homologicznymi. Z dalszych badań

wykonanych z surowicami wysyconymi wynika, że białkowe frakcje antygenowe maczugowców błonicy są rodzajowoswoiste, z wyjątkiem ostatniej frakcji wyekstrahowanej 15-procentowym ługiem, o swoistości gatunkowej.

Wszystkie frakcje nukleoproteinowe szczepu PW_8 reagowały z surowicą anty-*M. tuberculosis* $H_{37}RV$ w mianie 1 : 64 000-250 000; z surowicą anty-*M. phlei* tylko połowa frakcji, początkowe z nich w mianie 1 : 64 000-125 000. Poza tym z surowicą przeciw szczepowi PW_8 precypitowały frakcje nukleoproteinowe prątków gruźlicy i prątków tymotki w mianie 1 : 32 000-125 000. Wynika stąd istotne pokrewieństwo serologiczne frakcji nukleoproteinowych maczugowców błonicy i obu gatunków prątków kwasoopornych.

Frakcje nukleoproteinowe maczugowców rzekomo-błoniczych, serologicznie średnio aktywne (miano 1 : 16 000-64 000) oddziaływały, choć słabo (1 : 2000-64 000), z surowicą anty-PW_8. Dalsze badania wykonane z surowicami wysyconymi potwierdziły rodzajową swoistość tych frakcji. Ponadto ostatnia frakcja, wyekstrahowana 2-procentowym ługiem, wykazała serologiczne pokrewieństwo z pewnymi substancjami znajdującymi się w toksynie błoniczej.

Wszystkie frakcje nukleoproteinowe maczugowców rzekomo-błoniczych reagowały z surowicą przeciw-*M. tuberculosis* $H_{37}RV$ (miano 1 : 32 000-125 000), a pierwsza frakcja także z surowicą przeciw-*M-phlei*. Podobnie, początkowe frakcje obu gatunków prątków kwasoopornych reagowały z surowicą przeciw-*C pseudodiphtheriae* (K w a p i ń s k i 1956). Świadczy to o serologicznym pokrewieństwie frakcji nukleoproteinowych maczugowców rzekomo-błoniczych oraz prątków kwasoopornych.

W świetle omówionego materiału substancje nukleoproteinowe wszystkich badanych maczugowców i prątków kwasoopornych można uważać za antygenowo podobne.

3. ANTYGENY LIPIDOWE

Frakcje lipidowe otrzymane przez W o n g a i T'U n g a (1940) z maczugowców błonicy, *C. hofmanni*, *C. xerose* i dyfteroidów okazały się wspólne dla rodzaju *Corynebacterium*.

Podobnie w naszych badaniach (K w a p i ń s k i 1956 a, b) stwierdzono reagowanie pewnych frakcji lipidowych szczepu PW_8 i maczugowców Hofmanna w surowicach homologicznych (w wyższym mianie) oraz w surowicach heterologicznych dla gatunków rodzaju *Corynebacterium* i *Mycobacterium* (*M. tuberculosis* $H_{37}Rv$ i *M. phlei*). Również frakcje lipidowe prątków kwasoopornych okazały powinowactwo z przeciwciałami o surowicach przeciwmaczugowcowych.

Zagadnienie pokrewieństwa antygenowego alkoholowych wyciągów maczugowców i prątków kwasoopornych było już przedmiotem wcześniejszych badań. Krah i Witebsky (1950) przeprowadzili odczyn wiązania dopełniacza z alkoholowym wyciągiem prątków gruźlicy, maczugowców błonicy i maczugowców rzekomo-błoniczych w surowicach królików uodpornionych zabitymi zawiesinami tych bakterii. Wykazali oni, że krzyżowe wysycanie surowic odpornościowych szczepami heterologicznymi powodowało usunięcie z nich przeciwciał dla wyciągów alkoholowych heterologicznych szczepów bakterii.

Wydaje się, że lipidy maczugowców są antygenowo nieswoiste. Świadczą o tym również obserwacje Stubera (1915). Stwierdził on, że wstrzyknięcie tłuszczów maczugowców błonicy podskórnie zwierzętom doświadczalnym wywołało algutyniny dla pałeczek duru o mianie 1 : 6 000.

4. WŁAŚCIWOŚCI ANTYGENOWE TOKSYNY BŁONICZEJ

Toksyna wytworzona przez maczugowce błonicy nie jest substancją jednolitą pod względem antygenowym.

Z przesączu hodowli *C. diphtheriae* Pappenheimer i Lawrence (1948) wyosobnili 2 frakcje białkowe różniące się we właściwościach serologicznych. Podobne spostrzeżenia podał O'Meara (1940).

Fuks (1954) wykrył metodą serologiczną białka maczugowców błonicy w anatoksynie. Nie przypisuje jednak im właściwości uodporniających, ponieważ nie stwierdził różnic w sile immunogennej anatoksyny zwykłej oraz anatoksyny, z której usunięto białko bakteryjne przez absorpcję surowicą przeciwbakteryjną.

Metodą precypitacji w żelu wykazano, że w przesączach szczepu PW_4, zagęszczonych przez ultrafiltrację i frakcjonowanych 3,5 M fosforanem, znajduje się około 25 antygenów. Część antygenów to enzymy proteolityczne, wykazujące szczyt aktywności w charakterystycznym *pH* i zobojętniane swoistymi przeciwciałami znajdującymi się w uodpornionej surowicy końskiej. Obok nich znajdują się resztki haptenowe. Wysoce oczyszczona toksyna Pappenheimera zawiera 14 antygenów. Drogą specjalnego oczyszczania uzyskano preparaty złożone z 3 składników antygenowych. Ważne jest również stwierdzenie, że tak zwane „swoiste flokulki", powstające z reakcji toksyny błoniczej ze swoistą antytoksyną, zawierały oprócz toksyny i antytoksyny szereg innych antygenów i odpowiadających im przeciwciał. Bardzo dokładnie oczyszczona toksyna maczugowców błonicy traci swoją antygenowość i toksyczność (Tokiya Ito i Katake 1954).

Na podstawie własnych badań serologicznych (Kwapiński 1956) stwierdzono występowanie w maczugowcach błonicy i w toksynie (tokso-

idzie) wspólnych składników antygenowych, głównie o charakterze cukrowym, a częściowo proteinowym. Te immunologicznie ważne składniki cukrowe znajdują się w sympleksach z nukleoproteinami i mogą być uwolnione przez ekstrakcję odtłuszczonych maczugowców błonicy 0,05-0,2 N i 5-procentowymi roztworami ługu sodowego oraz wytrącone alkoholem z ekstraktu po uprzednim oddzieleniu składnika białkowego. Prawdopodobnie uwalniają się one samoistnie przy nieco dłuższej hodowli maczugowców, w której zachodzi autoliza.

5. WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE ANTYGENÓW MACZUGOWCÓW

a) Właściwości toksyczne. Trujący wpływ toksyny błoniczej na makroorganizm jest dobrze znany. Na ogół nie interesowano się natomiast toksycznymi właściwościami składników chemicznych komórki maczugowców.

Hirsch (1932) wykazał, że wyciągi wodne suchej masy maczugowców błonicy zabijały świnki morskie przy typowych objawach zatrucia toksyną błoniczą. Zawartości substancji toksycznej i azotu w wyciągach były przy tym niezależne od siebie, z wzrostem temperatury przy ekstrakcji wodą zwiększało się uwalnianie jadu. Celem zbadania toksyczności frakcji chemicznych maczugowców błonicy (Kwapiński 1956 a) wstrzykiwano ich roztwory lub zawiesiny wodne podotrzewnowo myszkom białym i świnkom morskim w ilościach 0,005-0,15 mg/g wagi. Ponadto wstrzyknięto myszkom i świnkom zawiesinę autoklawowanego szczepu PW_8. Stwierdzono, że wszystkie frakcje cukrowe, proteidowe i lipidowe maczugowców błonicy były toksyczne dla myszek białych w stosunkowo wysokim stężeniu, przeciętnie 0,05-0,15 mg/g wagi, dla świnek morskich w dawce 0,025 mg/g wagi. Autoklawowany szczep PW_8 był toksyczny w dawce 0,2-0,3 ml zawiesiny o gęstości optycznej D = 0,90.

Myszki białe padały po 2-5 dobach po wstrzyknięciu frakcji maczugowców w dawce toksycznej lub szczepu PW_8 autoklawowanego; świnki morskie padały przeciętnie po 10 dniach. Myszki białe i świnki morskie wykazywały podobną wrażliwość na frakcje maczugowców błonicy i na autoklawowany szczep PW_8. Zasługuje na uwagę fakt, że zawarty w substancjach komórki maczugowca błonicy czynnik toksyczny odznacza się znaczną ciepłoopornością. Toksyczne działanie frakcji maczugowców błonicy manifestowało się przekrwieniem i powiększeniem nadnerczy (wyraźnym u świnek morskich), wylewem krwawym do nadnerczy i przesiękiem w jamie opłucnowej, rzadziej w jamie otrzewnowej. Dość często obserwowano zrost worka osierdziowego z opłucną ścienną. Wszystkie te zmiany były podobne do obrazu spostrzeganego po wprowadzeniu toksyny błoniczej.

b) Właściwości alergizujące. Ustrój (ludzki i zwierząt) oddziałuje swoiście na śródskórne wprowadzenie maczugowców błonicy, toksoidu oraz niektórych frakcji maczugowców błonicy. Jak wykazał Stroeder (1942), nawet przy tak zwanej umiejscowionej błonicy (charakterystycznej dla najlżejszych postaci choroby), w zjawiska patologiczne wciągnięta jest oddalona od ogniska chorobowego skóra z jej naczyniami włoskowatymi. Oddziaływanie skóry na składniki lub metabolity maczugowców nie jest uwarunkowane błonicą lub uodpornieniem przeciw błonicy (Kalmykowa i Glusmann 1926, Stroeder i Schneider 1954).

Zarówno u świnek morskich uodparnianych, jak i u nieuodparnianych anatoksyną po wstrzyknięciu śródskórnie 0,1-0,2 ml zawiesiny zjadliwych maczugowców błonicy w soli fizjologicznej występował regularnie naciek przechodzący w martwicę w miejscu wstrzyknięcia (Kalmykowa i Glusmann 1926).

Pappenheimer i Lawrence (1948) oraz Kuhns i Pappenheimer (1952) wykazali, że czasem osobnicy zarówno z ujemnym, jak i z dodatnim odczynem Schicka reagują na śródskórne wstrzyknięcie toksoidu błoniczego lub frakcji P (formalinowane, nietoksyczne białko maczugowców błonicy). Ogółem odczyn dodatni typu rumienia po wstrzyknięciu 0,008 Lf wysoce oczyszczonego toksoidu wystąpił u 30,5% osób spośród 132 badanych studentów, przy czym w grupie osobników Schick + zanotowano rumień intensywniejszy i dwukrotnie częściej niż w grupie o ujemnym odczynie Schicka.

Stroeder i Schneider badali zmiany po śródskórnym wprowadzeniu głównych chemicznych składników maczugowców błonicy dzieciom zdrowym, oraz chorym na błonicę, płonicę lub gruźlicę. Zaobserwowano następujące reakcje: po wstrzyknięciu nukleoproteidów, jak również frakcji proteinowej rozpuszczalnej w etanolu, wystąpił obrzęk okolicznych węzłów chłonnych, zwyżka temperatury; na skórze w okolicy wstrzyknięcia wystąpiło nieznaczne zaczerwienienie w ciągu 15 minut oraz późna reakcja po 24-36 godzinach; u osobników Schick – zaś odczyn silniejszy. Po wstrzyknięciu wielocukrów (3% N i 1,7% P) zaobserwowano zaczerwienienie utrzymujące się 10 minut u dzieci zdrowych, 1-2 godzin u chorych na błonicę; późny rumień u wszystkich dzieci. Po wstrzyknięciu lipidów rozpuszczalnych w acetonie i alkoholu występowała szybka burzliwa reakcja w okolicy wstrzyknięcia: obrzęk, zaczerwienienie, po 20 minutach rumień, później martwica; podobną lecz mniej nasiloną reakcję bez martwicy stwierdzono pod wpływem lipidów rozpuszczalnych w alkoholu etylowym.

Lipidy rozpuszczalne w acetonie okazały się więc trujące. Odczyny po wszystkich frakcjach były silniejsze u dzieci chorych na błonicę niż

u zdrowych lub chorych na płonicę. Możliwe, że reakcja na substancje lipidowe z maczugowców błonicy są wyrazem alergii manifestującej się w narządzie skórnym.

Badając reagowanie świnek morskich na frakcje proteidowe, cukrowcowe i lipidowe maczugowców PW_8, wprowadzone śródskórnie, nie zauważyłem podobnie silnych reakcji skórnych. Odczyny uwidaczniały się jedynie w postaci zaczerwienienia i lekkiego obrzęku po wprowadzeniu frakcji lipidowych, proteinowych i cukrowych. Próba kontrolna z roztworem fizjologicznym była ujemna. Po wstrzyknięciu anatoksyny i ogrzanego szczepu PW_8 występował odczyn skórny o typie podobnym jak po wstrzyknięciu poszczególnych frakcji chemicznych szczepu PW_8.

c) Właściwości uodporniające. Wstrzykiwanie toksoidu błoniczego wywołuje powstawanie antytoksyny, wstrzykiwanie natomiast zabitych maczugowców powoduje wzrost bakteriobójczej mocy surowicy oraz wskaźnika opsonicznego (Wildführ 1950).

Uodparniające działanie toksoidu zmienia się zależnie od stopnia jego oczyszczenia.

Murata i Kurakowa (1952) wykazali, że frakcje toksoidu wytrącone siarczanem amonowym w stężeniu poniżej 30% posiadały mniejszą moc uodparniającą niż frakcje wytrącone tą solą w stężeniu 30-60%. Doświadczenia Apanaszenki i Niechotenowej (1955) wskazują, że toksoid silnie oczyszczony, z którego usunięto znaczną część substancji pochodzących z komórek maczugowców, posiada mniejsze właściwości odpornościowe. Udowodniono przy tym, że ta ilość białka, która pozostaje w jednorazowo oczyszczonej anatoksynie, nie wpływa na wytwarzanie odporności antytoksycznej. Lahiri (1952) wykazał, że podczas wzrostu maczugowców błonicy na bulionie cielęcym z proteozo-peptonem wytwarzane są pewne substancje — „adiuwanty" — które mogą wzmagać immunogenne właściwości oczyszczonego toksoidu błoniczego, jeśli są wraz z nim wstrzykiwane. Te substancje usuwane przy oczyszczaniu toksoidu są dobrze rozpuszczalne w wodzie, adsorbują się na węglu aktywowanym, z którego można je eluować rozcieńczonym ługiem sodowym. Oprócz nich znajdują się jednak zanieczyszczenia nierozpuszczalne w wodzie oraz rozpuszczalne, lecz nie adsorbujące się na węglu aktywowanym. Te zanieczyszczenia hamują immunogenne właściwości toksoidu lub są względem nich obojętne. Same „adiuwanty" wstrzyknięte bez toksoidu śwince morskiej nie wywołują odporności przeciwbłoniczej. Charakter chemiczny „adiuwantów" nie został zbadany, zależy on jednak w znacznym stopniu od składników pożywki.

Wydaje się, że wstrzykiwanie samego toksoidu, zwłaszcza oczyszczonego, nie zawsze powoduje wystarczającą odporność, lub czasem w ogóle jej nie wzbudza. Simnic i Ivanowic (1931) wykazali u zwierząt

skuteczne lecznicze działanie surowicy wysokowartościowej, uzyskanej po uodpornieniu królików specjalnymi szczepami maczugowców błonicy wywołującymi bakteriemię. Surowica ta miała wysokie miano przeciwbakteryjne, niskie antytoksyczne.

Borodczuk (1956) uodpornił świnki morskie podskórnie zawiesiną maczugowców błonicy spłukaną z pożywki Löfflera, ogrzaną w temperaturze 75-80° w ciągu godziny. Szczepienia wykonano siedmiokrotnie, wstrzykując od 2 miliardów komórek wzwyż. W surowicy nie wykryto śladu antytoksyny. U świnek uodpornionych zakażenie błonicze przebiegało lżej niż u zwierząt nieuodpornionych, a okres przeżycia był dłuższy. Lepsze wyniki uzyskano uodporniając przeciw jednoimiennemu szczepowi szczepem typu *gravis* niż *mitis*. Lautrop (1955) uodpornił świnki morskie hodowlą atoksycznego szczepu maczugowców błonicy i stwierdził, że szczepienie to chroniło 50% zwierząt przed śmiertelnym zakażeniem toksycznym tego samego typu serologicznego. Z dalszych badań Lautropa (1955) wynika, że antygen *O* maczugowców błonicy nie ma mocy stymulowania odporności przeciwbakteryjnej, zaś gatunkowo swoisty antygen *K* pobudza mechanizmy odpornościowe makroorganizmu.

Właściwości immunogenne endotoksyn i pewnych substancji somatycznych maczugowców wykazali też Frobisher i Parsons (1950) oraz Kwapiński (1956).

Frobisher i Parsons sporządzili ze zmacerowanych, mechanicznie rozbitych maczugowców grupy *gravis* i *mitis*, zjadliwych i niezjadliwych, wyciągi w 0,85-procentowym NaCl i w mieszaninie alkoholo-eterowej. Wyciągi te wstrzykiwano świnkom morskim 6-krotnie co 7 dni, po czym zakażano je, wstrzykując podskórnie 0,2 ml 48-godzinnej zawiesiny hodowli szczepu *gravis* lub *mitis*. Uzyskano wyniki przeżycia, przedstawione w tabeli XII.

Tabela XII

Szczep	Liczba zaszczepionych	Przeżyło	
		ogółem	ponad 12 dni
Gravis zjadliwy	46	25	5 — 13
			13 — 46
Gravis niezjadliwy	45	19	15 — 45
Mitis zjadliwy	58	36	14 — 27
Mitis niezjadliwy	27	14	3 — 27
PW_8 niezjadliwy	43	6	5 — 43
Nie szczepione	36	2	—

Z tabeli XII wynika, że najskuteczniej uodporniały antygeny somatyczne zjadliwego szczepu *mitis*.

W badaniach własnych (Kwapiński 1956) świnkom morskim

wstrzykiwano podskórnie po 1 mg poszczególnych frakcji (cukrowych, nukleoproteinowych i lipidowych) szczepu PW_8. Kilku świnkom wprowadzono 0,5 ml zawiesiny autoklawowanej szczepu PW_8 lub 0,2 ml anatoksyny błoniczej. W pierwszej serii doświadczeń wstrzykiwanie wykonano jednokrotnie, w dalszej serii dwukrotnie w tej samej dawce, w odstępach 10-14-dniowych. Po 14-20 dniach po ostatnim wstrzyknięciu wszystkie świnki oraz świnkę kontrolną (nie uodpornioną) zakażono podskórnie jednakową dawką zawiesiny żywego szczepu PW_8.

Do III serii badań wybrano frakcje maczugowców błonicy, które przyczyniły się w poprzednich doświadczeniach do największego przeżycia świnek morskich oraz nie wywoływały objawów toksycznych. Wybrane mieszaniny frakcji maczugowców błonicy wstrzyknięto podskórnie dwukrotnie w odstępach 10-dniowych grupom złożonym z 10 świnek morskich. Dla porównania mniejszym grupom świnek wstrzyknięto dwukrotnie anatoksynę błoniczą oraz autoklawowany szczep PW_8 w dawkach stosowanych w poprzednich doświadczeniach, poza tym szczep maczugowców rzekomo-błoniczych *Nr 124* (autoklawowaną zawiesinę 48-godzinnej hodowli o gęstości optycznej D = 0,30, w objętości 0,2-0,3 ml).

Tabela XIII

Mieszanina frakcji chemicznej	Liczba świnek	Przeżyły okres doświadczalny (30—60 dni)
N_2R	10	8
N_2C_2R	10	8
$N_2C_3N_9R$	10	10
N_2C_2	10	10

Właściwości immunogenne i ochronne wykazały cztery mieszaniny frakcji chemicznych szczepu PW_8 (tabela XIII).

Z badań tych wynika, że właściwości uodparniające i ochronne przeciw zakażeniu żywym szczepem maczugowców posiadają mieszaniny frakcji maczugowców błonicy zawierające następujące substancje: a) nukleoproteiny ekstrahowane 0,2N NaOH na zimno oraz 15-procentowym NaOH na gorąco, b) cukrowe frakcje zasadowe otrzymane z ekstraktu 0,05N i 0,2N NaOH po oddzieleniu odnośnych frakcji nukleoproteinowych, c) frakcja „resztkowa" *R* (glikoproteid ciepłooporny).

Praktyczne wnioski wypływające z omówionych zagadnień nie mogą być tu szczegółowo omawiane. Wydaje się jednak konieczne podkreślenie następujących faktów:

Zmiany patologiczne w makroorganizmie wywołuje toksyna błonicza oraz żywe komórki maczugowców (łącznie z endotoksyną). Najpierw jednak w ciągu pierwszej doby jako odczyn ustroju na wnikające i osiedlające się w tkankach maczugowce występuje zwyrodnienie komórkowo-tkankowe i martwica. W przyległej okolicy znajdują się nieliczne bakterie, które uniknęły fagocytozy i zaczynają się rozmnażać, a równocześnie wytwarzać toksynę. Wyprodukowana toksyna błonicza wstrzymuje

miejscową reakcję zapalną. Sprzyja to szybkiemu rozmnażaniu się maczugowców, wskutek czego proporcjonalnie wzrasta wytwarzanie toksyny.

Takie następstwo zjawisk wykazane zostało doświadczalnie przez Turewicza i Kotszetową (1934) oraz Amiesa (1954). Istnienie okresu bakteriemii, zwłaszcza we wczesnym okresie zakażenia i w ciężkich postaciach błonicy, wykazali między innymi Przesmycki, Goliborska, Lachowicz i Seydel (1938), Wildführ (1949), Koch i Roemer (1952).

W niektórych przypadkach maczugowce błonicy utrzymują się w organizmie po wyzdrowieniu i czasem znikają dopiero po 30 dniach od początku choroby (Dadashyan 1952). Nosiciele maczugowców błonicy i ozdrowieńcy mogą zawierać zjadliwe maczugowce pomimo posiadania wystarczającej ilości antytoksyny w krwiobiegu.

Istnienie hypertoksycznych, opornych na antytoksynę typów błonicy tłumaczono jako skutek nienormalnie wysokiej wrażliwości tkanek: toksyna miała być wówczas silnie związana przez komórki mięśnia sercowego, przed zastosowaniem surowicy antytoksycznej. Nie wydaje się jednak, aby niezobojętnienie toksyny przez antytoksynę było jedyną przyczyną wspomnianego zjawiska. Bingel (1918 i 1919) wykazał, że u chorych na błonicę leczonych antytoksyczną surowicą śmiertelność nie ulegała obniżeniu pod jej wpływem. Śmiertelność w grupie 1032 chorych, leczonych antytoksyną, wyniosła bowiem 8,6%, a w grupie 950 osób, którym podawano normalną surowicę końską, 8,1%.

Surowica przeciwtoksyczna nie zawiera wszystkich przeciwciał przeciw maczugowcom błonicy. Mc Sweeney (1941) podkreśla, że antytoksyna oczyszczona, a zwłaszcza nowoczesne preparaty swoistej globuliny antytoksycznej, zawierają mniej wartościowych przeciwciał odpornościowych niż dawna surowica nieoczyszczona. Oczyszczona antytoksyna, przygotowana przez wytrawienie pepsyną, nie wywiera bezpośredniego działania na maczugowce błonicy *in vitro*: maczugowce rozwijają się w pożywce zawierającej 200 j. A/ml. Obowiązkowe szczepienia dzieci anatoksyną błoniczą obniżyły wprawdzie zachorowalność około 8-12-krotnie, a śmiertelność ponad 20-krotnie (Ramon 1956, Ter-Pogosjan 1956), lecz liczby te nie świadczą o bardzo skutecznej zdolności immunologicznej toksoidu. Wykazano bowiem, że u 12-33% dzieci uodpornionych toksoidem błoniczym nie wytwarza się dostateczna odporność. Ter-Pogosjan (1956) podaje, że w latach 1950-1952 na błonicę zachorowalność dzieci szczepionych oczyszczoną adsorbowaną anatoksyną wynosiła 0,09%, a dzieci szczepionych (dwukrotnie) rodzimą anatoksyną 0,073%.

Z przytoczonych badań wynika, że w wytworzeniu przeciwbłoniczej odporności czynnej i biernej ważną rolę obok ektotoksyny odgrywają składniki somatyczne maczugowców błonicy.

LITERATURA

Apanaszenko N., Niechotonowa E., 1955: *Żurnał Mikr. Epid. Imm.* **2**: 27.
Amies C., 1954: *J. Path. Bact.* **67**: 1125.
Bailey G., 1925: *J. Immunol.* **10**: 791.
Barron E., Ardao M., Hearon M., 1950: *Arch. Biochem.* **29**: 130.
Bell A., 1922: *J. Roy. Army Med. Corps* **38**: 48.
Bendix E., 1901: *Dtsch. med. Wochschr.* **2**.
Bingel A., 1918, 1919: *Dtsch. Arch. Klin. Med.* **125**: 284, **74**: 101.
Biełozierski A., Korczagin W., Smirnow T., 1955: *Dokł. Ak. Nauk SSRR.* **1**: 89.
Borodczuk N., 1956: *Żurnał Mikr. Epid. Immun.* **87/2**: 99.
Bull C., Mc Kee, 1924: *Amer. J. Hyg.* **4**: 101.
Carlson A., Hahre R., 1949: *J. Biol. Chem.* **177**: 281.
Carlson A., Hahre E., Neill J., 1947: *Science* **106**: 523.
Chargaff E., 1931: *Zeitschr. physiol. Chemie.* **200**: 196.
Dadashyan M., 1952: *Pediatrija.* **1**: 45.
Dernby K., Walbum L., 1923: *Biochem. Zeitschr.* **138**: 504.
Durand P., 1918: *C. R. Soc. Biol.* **81**: 1011.
Durand P., Guerin J., 1921: *C. R. Soc. Biol.* **84**: 980.
Eagleton A., Baxter E., 1923: *J. Hyg.* **22**: 107.
Frobisher M., Parsons E., 1950: *Amer. J. Hyg.* **52**: 239.
Fuks J., 1954: *Żurnał Mikr. Epid. Immun.* **8**: 72.
Gubariew E., 1941, 1942: *Sbornik Trud. WIEM.* **1**: 77, **1**: 77.
Gubariew E., 1942: *Biochimija.* **7**: 180.
Gubariew E., Lubieniec E., 1948: *Dokł. Akad. Nauk SSRR.* **10**: 413.
Gubariew E., Gałajew J., 1953: *Biochimija* **18**: 37.
Gubariew E., Gawriłowicz A., Sztulbaum F., 1952: *Biochimija.* **17**: 303.
Gubariew E., Lubieniec E., Kauczuk A., 1951: *Biochimija.* **16**: 139.
Gubariew E., Wakulenko J., 1945: *Biochimija.* **10**: 285.
Havens L., 1920: *J. Inf. Dis.* **26**: 388.
Hewitt L., 1947: *Brit. J. Exp. Path.* **28**: 338.
Hirsch J., 1932: *Z. Hyg.* **114**: 195.
Hosoya S., Yokohama M., 1953: *Yokohama Med. Bull.* **4**: 69.
Holdsworth E., 1952: *Biochem. Biophys. Acta.* **8**: 110.
Holdsworth E., 1951: *Biochem. J.* **49**: XIV.
Hottinger A., 1933: *Z. Kinderheilk.* **54**: 440.
Kalmykowa M., Glusmann M., 1926: *Zentr. Bakter.* **I**, 0. 98: 308.
Koch O., Roemer G., 1952: *Z. ges. inn. Med.* **7**: 539.
Kuhns W., Pappenheimer J., 1952: *J. Exp. Med.* **95**: 363, 375.
Krah E., Witebsky E., 1930: *Z. Immunitätsfg.* **66**: 59.
Kolmer J., 1912a: *J. Inf. Dis.* **11**: 44.
Kolmer J., 1912b: *J. Med. Res.* **26**: 372.
Kurazina R., 1955: *Żurnał Mikr. Epid. Immun.* 1.
Kwapiński J. 1956: *Acta Microb. Polon.* **5**: 321.
Kwapiński J., 1956a: *Biulet. PAN* (w druku).
Kwapiński J., Piekacz, 1956: (w druku).
Langer H., 1916: *Zentr. Bakter.* **78**: 117.
Lahiri D., 1952: *Indian J. Med. Res.* **2**: 265.
Lautrop H., 1950 i 1955: *Acta Path. Microb. Scand.* **26**: 443, **36**: 274.
Lawrence H., Pappenheimer J., 1948: *J. Amer. J. Hyg.* **47**: 226.

Mann S., 1922: *J. Immunol.* **7**.
Mansheim E., 1930: *Zentr. Bakter.* **115**: 113.
Menton J., Cooper T., Fussell W., 1933: *Lancet.* **2**: 182.
Murata R., Kurakowa M., 1952: *Jap. med. Sci. biol.* **5**: 239.
Minzel G., Freeman V., 1950: *Amer. J. Hyg.* **51**: 300.
Neill J., Fleming, Gaspari, 1931: *Amer. J. Hyg.* **13**: 499.
Nicolas J., 1896: *C. r. Soc. Biol.* **48**: 817.
Nishimoto G., 1936: *Z. Immunitätsfg.* **89**: 18.
Oeding P., 1949: *Acta Path. Microb. Scand.* **26**: 862.
O'Meara R., 1940: *J. Path. Bakt.* **51**: 317.
Orłowa O., 1950: *Biochimija.* **15**: 362.
Orłowa O., 1953: *Biochimija.* **18**: 683.
Orr-Ewing J., 1953: *K. Path. Bact.* **37**: 345.
Pappenheimer A., Lawrence H., 1948: *Amer. J. Hyg.* **47**: 226.
Pillemer L., Toll D., Badger S., 1947: *J. Biol. Chem.* **170**: 21.
Przesmycki F., Goliborska T., Lachowicz K., Seydel J., 1936, 1938: *Med. Dośw. Mikr.* **22**: 25, **23**: 1.
Pudles J., Lederer E., 1951: *Bull. Soc. Chim. Biol.* **33**: 1003.
Pudles J., Lederer E., 1953: *Biochim. Biophys. Acta.* **11**: 163.
Poxson W., Redowitz E., 1922: *J. Immunol.* **7**: 69.
Prevot R., Thonvenot H., 1952. *Ann. Inst. Pasteur.* **83**: 413.
Ramon G., 1956: *Żurnał Mikr. Epid. Immun.* **6**: 3.
Robinson D., Peeney A., 1936: *J. Path. Bact.* **33**: 403.
Rosenthal S., Cox C., 1953: *J. Bact.* **65**: 532.
Salssac R., Raynaud M., 1951: *Ann. Inst. Pasteur.* **80**: 434.
Simic, Ivanovic, 1931: *Zentr. Bakter.* **120**: 432.
Scott W., 1923: *Rep. Publ. Health.* **22**: 40.
Smith J., 1923: *J. Hyg.* **22**: 1.
Stone R., 1924: *J. inf. Dis.* **34**: 312.
Stuber, 1915: *Münch. med. Wochschr.* 1173.
Stroeder J., 1942: *Erg. inn. Med.* **62**.
Stroeder J., Schneider D., 1954: *Ztschr. Hyg. Infkr.* **139**: 9.
Smirnowa M., 1955: *Biochimija.* **20**: 300.
Sweeney C., 1941. *Lancet.* **1**: 208.
Spanedda A., 1937: *Bull. Soc. Int. Micr. Ital.* **9**: 32.
Tamura S., 1914: Hoppe-Seyl. *Ztschr. phys. Chem.* **89**: 289.
Tokiya Ito, Katake, 1954: *Excerpta Medica.*: 3406.
Turewicz E., Kotszetowa W., 1934: *Giorn. Batt. Immun.* **13**: 635.
Ter-Pogosjan R., 1956: *Żurnał Mikr. Epid. Immun.* **1**: 63.
Wildführ G., 1949: *Zentr. Bakter.* **154**: 14.
Wildführ G., 1950: *Z. ges. inn. Med.* **5**: 765.
Wong S., T'Ung T., 1938a: *Proc. Soc. Biol. Med.* **38**: 107.
Wong S., T'Ung T., 1938b: tamże, **39**: 422.
Wong S., T'Ung T., 1939a: tamże, **42**: 824.
Wong S., T'Ung T., 1939b: tamże, **40**: 356.
Wong S., T'Ung T., 1939c: tamże, **41**: 160.
Wong S., T'Ung T., 1940a: tamże, **43**: 749.
Wong S., T'Ung T., 1940b: tamże, **45**.
Wong S., T'Ung T., 1940c: *Chinese Med. J. suppl.* **III**.
Work E., 1949; 1951: *Biochem. J. V*: **46**, **49**: 17.
Work E., 1950: *Biochim. Biophys. Acta.* **5**: 204.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1957, 6, 171-183

I. Michalska

FLORA GRZYBOWA I BAKTERYJNA JAKO CZYNNIK NISZCZĄCY WEŁNĘ OWCZĄ *

Z Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN w Bydgoszczy
Wpłynęło dnia 18 stycznia 1957 r.

Wełna owcza jako produkt zwierzęcego pochodzenia charakteryzuje się szeregiem właściwości związanych z organizmem zwierzęcia oraz ze środowiskiem, w którym zwierzę przebywa. Miarą użytkowej wartości wełny są jej cechy fizyko-mechaniczne kształtowane przez czynniki genetyczne zwierzęcia i środowisko.

Jednym z czynników środowiska mogą być drobnoustroje, które wraz z kurzem i brudem zanieczyszczają wełnę, a znajdując odpowiednie warunki rozwijają się i ujawniają swą destrukcyjną aktywność względem włókna.

W ostatnim pięćdziesięcioleciu zwrócono uwagę na zjawiska mikrobiologicznego niszczenia wełny, brano jednak pod uwagę głównie fabrykaty wełniane (Mandels 1948, White, Mandels, Siu 1950, Moore 1953, i inni). Stwierdzono, że są one mniej podatne na działanie drobnoustrojów niż artykuły bawełniane. Spostrzeżono też, że fabrykaty wełniane są przenosicielami wielu grzybków chorobotwórczych dla człowieka.

Wzmianki o mikroflorze wełny surowej są bardzo skąpe, a charakterystyki mikroflory wełny na owcy w dostępnej nam literaturze nie spotykaliśmy.

Pierwszym, który zaczął odróżniać wełnę surową od jej fabrykatów, był Burgess (1924-1931). Stwierdził on, że nieliczne szczepy grzybków dały się wyhodować, a nawet owocowały na wełnie. Powodzenie hodowli przypisywał jednak zhydrolizowaniu wełny przy sterylizacji. Prindle (1935) i Brűssof (1953), badając próbki wełny znaleźli

* Wszystkie zdjęcia do pracy wykonał mgr A. Ziołecki.

wielką ilość saprofitycznych bakterii i pleśni typowych dla gleby, wody i powietrza i stwierdzili, że wykazują one zdolność do całkowitej degradacji wełny, lub zdolność do wybarwienia jej bez destrukcji.

Morfologiczna i chemiczna struktura włókna wełnianego została opracowana szczegółowo dopiero w ostatnim dziesięcioleciu przez Race'a (1946), Beinbridge'a, Mercera i innych (za Burnthallem 1952 i Prescottem a. Dunn 1940) i tym tłumaczy się, że dorobek w zakresie mikrobiologii włókna jest jeszcze bardzo ubogi w porównaniu z dorobkiem z dziedziny włókna roślinnego.

Z punktu widzenia chemii włókno jest włóknistą proteiną, zbyt złożoną aby bez przejścia pewnych modyfikacji mogła służyć jako pożywienie dla grzybów i bakterii.

Morfologiczna budowa włókna odgrywa również bardzo poważną rolę w rozkładzie wełny przez mikroorganizmy. Z grubsza rozróżniamy w włóknie zewnętrzną łuskowatą kutikulę i część centralną to znaczy korę (*cortex*), złożoną z wrzecionowatych, równolegle do osi włókna rozmieszczonych komórek.

W kutikuli zdołano wyróżnić cztery warstwy: epi-, exo-, endo- i subkutikularną, z których jedynie pierwsza — epikutikula — jest bardzo odporna na działanie kwasów, alkalii oraz enzymów i stanowi barierę między drobnoustrojami, a dalszymi warstwami kutikuli i korą (Doehner 1954, Burnthall 1952, Mandels 1948, Kuzniecow 1950).

Komórki kory zbudowane są z fibrilli i mikrofibrilli, zcementowanych bezpostaciową masą, tak zwanym lepiszczem, które jest doskonałą pożywką dla drobnoustrojów, substancja ta nie jest dotąd zbadana ani chemicznie ani histologicznie. Uszkodzenie mechaniczne lub chemiczne epikutikuli czyni włókno podatnym na dalsze chemiczne uszkodzenia przez kwasy, zasady i czynniki utleniające, przy czym produkty tego rozkładu są już przyswajalne dla drobnoustrojów.

Meeuse, Hietink i Gorten (1950) analizując procesy jakim ulega wełna pod wpływem warunków atmosferycznych (działalność światła słonecznego, wody, tlenu powietrza) oraz środków chemicznych, moczu, potu i uszkodzeń mechanicznych obserwowali opad łusek na wierzchołkach włosów, zmniejszenie elastyczności, kruszenie włosów. Te czynniki fizyczne i chemiczne torują drogę dla drobnoustrojów, które z kolei prowadzą do rozpadu włókna czyli do tak zwanej fibrilizacji.

Uszkodzenie wełny przez drobnoustroje zaliczamy do typu uszkodzeń biochemicznych. Stopień zanieczyszczenia zależy od nasilenia działającego czynnika, od ilości i typu drobnoustrojów oraz od warunków środowiskowych. Wynika z tego, że drobnoustrojowe niszczenie wełny musi być uwarunkowane obecnością jakiegoś wstępnego źródła pożywienia, niezbędnego dla rozpoczęcia cyklu wzrostowego drobnoustrojów. W miarę

rozwoju drobnoustroje wytwarzają enzymy zdolne do rozkładu złożonych protein. Zniszczenie warstwy kutikularnej jest otwarciem dróg do niszczenia lepiszcza i rozluźniania komórek kory.

Wstępnym źródłem pożywienia dla zapoczątkowania wzrostu drobnoustrojów w warunkach naturalnych (owczarnia, magazyny) mogą być organiczne zanieczyszczenia wełny zmieszane z tłuszczopotem.

Proces niszczenia wełny przez mikroorganizmy, bez uprzednich uszkodzeń mechanicznych, zachodzi bardzo wolno (P u i g 1950). Przypuszcza się, że enzymy wydzielone przez drobnoustroje przenikają do wnętrza komórek korowych i niszczą ich treść, a rozpuszczone produkty dyfundują poza obręb komórek, gdzie są zużyte na przykład przez pleśnie, lub akumulowane w roztworze ich kultury. Wzrost grzybni jest równoległy do osi włókna (M a n d e l s 1948). Nie zauważono dotąd czy strzępki przedostają się pomiędzy komórki kory, przypuszcza się jednak, że mogą przechodzić przez miejsca uszkodzone w kutikuli lub przez końce włosów.

Ścisłe badania chemicznej degradacji wełny (należy tu degradacja przez drobnoustroje) są oparte na absorpcji barwików, stwierdzonej przy pomocy mikroskopu elektronowego. H o c k, M c M u d r i e, M e r c e r. R e e s (za M a n d e l s e m 1948) wykazali tą metodą, że wewnętrzna część łusek nie jest odporna na działanie enzymów i chemiczne reakcje i że ulega ona rozpuszczeniu.

BADANIA WŁASNE

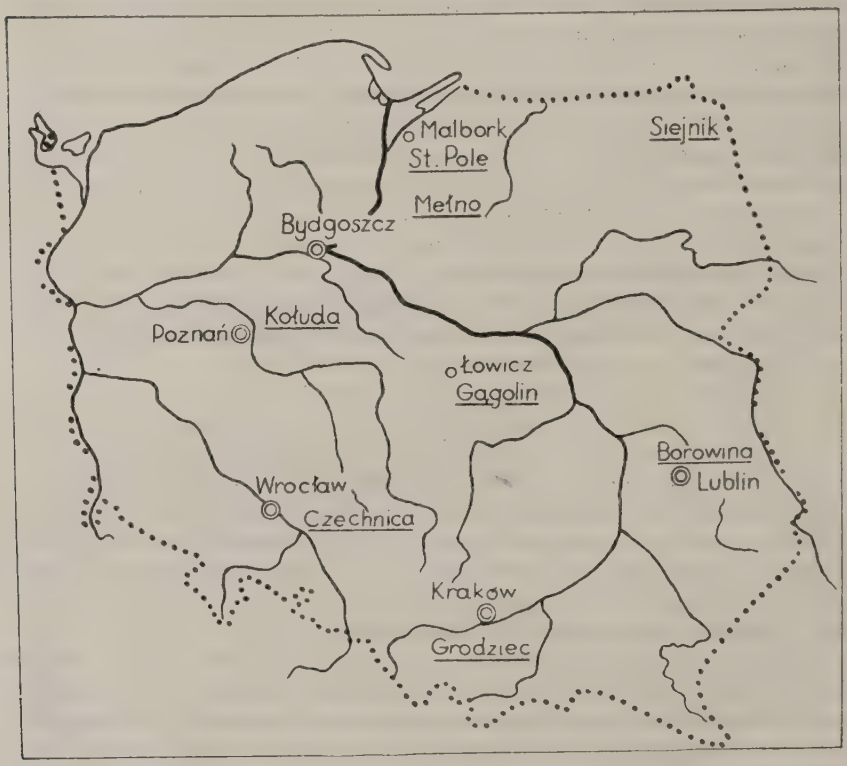
Niniejsza praca objęła badania nad mikroflorą wełny owiec krajowych pod kątem widzenia zdolności jej do degradacji włókna wełny.

Uwzględniliśmy dwa zagadnienia: 1) charakterystykę mikroflory wełny na owcy pod względem wysokości zakażenia oraz składu gatunkowego, 2) ocenę niszczycielskiej działalności mikroflory zakażającej wełnę na owcy w stosunku do włókna wełny.

Badania zostały przeprowadzone w latach 1954-1955. Uzasadnieniem podjęcia badań był brak w kraju jakichkolwiek danych w tym przedmiocie, a równocześnie stałe stwierdzanie na wełnie surowej w magazynach, na wełnie fabrycznej i na fabrykatach wełnianych cech zepsucia wyrażających się pojawieniem się plam pleśniowych, zagrzewaniem wewnątrz beli, wydawaniem odoru zepsucia, nie przyjmowaniem barwika przez wełnę i innymi objawami towarzyszącymi zazwyczaj zepsuciu materii organicznej przez drobnoustroje.

Do badań użyto próbki wełny owiec różnych ras pochodzących z owczarni całego kraju (rys. 1). Ogółem uwzględniono 12 różnych ras i krzyżówek owiec z 8 owczarni:

Koluda — merynoprekos,
Mełno — merynoprekos, merynos × texel,
Borowina — łowicka × texel, łowicka, świniarka × berichon x texel,
Gągolin — kent, łowicka, łowicka × merynos,
Stare Pole — texel,
Siejnik — łowicka, łowicka × kent,
Czechnica — merynos, pomorska,
Grodziec Śląski — nowa górska.



Rys. 1. Mapka miejscowości, w których pobierano próbki wełny

W każdej owczarni wybierano przez losowanie do dziesięciu osobników zdrowych owiec lub baranów, których wełna miała wygląd przeciętny. Dla zapewnienia dostatecznej reprezentatywności prób pobierano je topograficznie z tych samych miejsc: z głowy, łopatek, grzbietu, kulek i nasady ogona. Uwzględnienie wyżej wymienionych części ciała tłumaczy się tym, że jakość wełny w runie zmienia się stopniowo począwszy

od łopatek, gdzie stwierdzamy najdelikatniejszą wełnę, w kierunku kulki, na której jest ona najgrubsza, a także tym, że zanieczyszczenie wełny na owcy jest nierównomierne.

Próbki pobierano odkażonymi alkoholem rękami i każdą umieszczano w oddzielnej, wyjałowionej kopercie, zapisując miejscowość, datę pobrania próby oraz numer ewidencyjny owcy, zaznaczając równocześnie z jakiej części ciała została pobrana próbka.

Charakterystykę mikroflory wełny oparto na analizie mikrobiologicznej pobranych próbek. Próbki te zostały przygotowane z siedmiu elementarnych próbek z każdej owcy, jako próbki łączne, jednostkowe. Dokonywano tego w warunkach jałowych (w komorze, jałowymi pensetami, w jałowych naczyniach). Pensetami rozluźniano próbki elementarne, wybierano z nich pojedyncze włókna wyrywkowo i tworzono średnie próbki o wadze 100 mg. Średnie próbki jednostkowe umieszczano w jałowych erlenmayerkach z 10 ml fizjologicznego roztworu NaCl i tłuczonym szkłem. Przez staranne wykłócenie zawartości otrzymywano zawiesinę wyjściową, którą rozcieńczono (od 10^{-1} do 10^{-6}) i używano do zakażania płytek Petriego (po 1 ml) z odpowiednio dobranymi pożywkami dla bakterii oraz dla grzybów.

Dla dokonania oznaczeń ilościowych stosowano ogólnie przyjętą metodę zliczania kolonii wyrosłych z posiania zawiesiny o znanym rozcieńczeniu i przeliczenia na 1 g wyjściowego materiału.

Z uzyskanych w ten sposób kolonii drobnoustrojów izolowano poszczególne szczepy i wyprowadzano ich czyste kultury. Przy identyfikowaniu bakterii posługiwano się kluczem Bergey'a (1948), przy oznaczaniu promieniowców — kluczem Krasilnikowa (1949), grzyby zaś opisywano na podstawie prac szeregu autorów (Corda 1837-1854, Heinrici 1930, Kudriawcew 1954, Lafar 1904-1914, Lembke 1953, Lindau 1952, Rabenhorst 1904, Skirgiełło 1954, Smith 1947, Thom i Church 1920, Zycha 1935).

Wyosobnione czyste kultury drobnoustrojów wykorzystano do badań nad mikrobiologicznym psuciem wełny. Do tego celu użyto czterech rodzajów wełny: 1) mieszankę krajową, 2) krzyżówkę krajową nie praną, 3) krzyżówkę krajową praną fabrycznie (przygotowane przez Instytut Włókiennictwa w Łodzi) oraz 4) merynosową (pochodzącą z naszych owiec doświadczalnych).

Wyżej opisaną metodą przygotowano z każdego rodzaju wełny 100-miligramowe próbki, licząc po trzy próbki na każdy wyodrębniony szczep drobnoustrojów. Przed posianiem na nich drobnoustrojów próbki wyjaławiano.

Zagadnieniem sterylizacji wełny zajmowali się: Humfeld, Elmquist i Kettering (1937), a także Race (1946) i inni. Stwierdzili

oni, że fabrykaty wełniane mogą być bez narażenia na uszkodzenie wyjaławiane w ksylenie: w 100° ogrzewane 12 godzin, w 121° — 2 godziny, a w 134,5° — 1 godzinę. Fizyczne i chemiczne właściwości wełny ulegały niszczeniu przy ogrzewaniu parokrotnym pod parą i w autoklawie pod ciśnieniem. Poddanie wełny działaniu promieni ultrafioletowych, nadmanganianu potasu, alkoholi itp. nie dawało wyników zadowalających. Formaldehyd i sole rtęciowe dobrze sterylizują tkaniny wełniane, lecz nie nadają się do stosowania ich w praktyce. Najlepszą metodą podaną przez Race (1946) i Stoves (1952) jest 15-minutowa sterylizacja wełny zalanej wrzącą wodą przez 3 kolejne dni.

Ponieważ metoda sterylizacji we wrzącej wodzie okazała się zadowalająca, zastosowano ją w niniejszej pracy. W tym celu przywiązano próbki wełny do szklanych bagietek, umieszczono w probówkach i zalewano wodą. Po trzydniowej sterylizacji wodę zlewano, a po przesuszeniu trwającym kilka dni próbki były gotowe do posiewu (tablica I. fot. 1). Sterylność próbek kontrolowano metodą mikroskopową określając stopień zanieczyszczenia włókien przez barwienie ich błękitem metylenowym o stężeniu 0,002 do 0,003%. Kawałki włókien umieszczano na szkiełku mikroskopowym, w kropli błękitu metylenowego i przykrywano szkiełkiem przykrywkowym (Elmquist 1935, Meeuse 1950). Nie uszkodzone włókno barwiło się na niebiesko. Uszkodzone absorbowało barwik w miejscach uszkodzonych.

Próbki zasiewano 0,5 ml zawiesiny bakterii lub zarodników grzybów, sporządzonej w rozcieńczonym bulionie mięsno-peptonowym z glukozą. Mały dodatek bulionu podany ze szczepionką potraktowano jako źródło pożywienia dla zapoczątkowania wzrostu drobnoustrojów. Raistrick i Clark, według Puiga (1950), wykazali bowiem, że rozkład protein przebiega szybciej w obecności źródła węgla w formie węglowodanów i że powstający amoniak służy bakteriom do syntezy.

Bakterie hodowano w temperaturze 37° przez 3 dni, a grzyby w temperaturze 25° przez 10 dni do 3 tygodni. Wzrost drobnoustrojów w tych optymalnych dla nich warunkach wystąpił mniej lub więcej obficie na wszystkich próbkach wełny. Próbki kontrolne, zalane jałowym bulionem, zostały jałowe i nie zmienione. Sposób hodowli drobnoustrojów na próbkach wełny w warunkach sterylnych ilustruje tablica II, fot. 2.

Po zakończeniu inkubacji próbki wełny wyjęto wraz z bagietkami z probówek, wymyto w letniej bieżącej wodzie lekko wyciskając palcami i rozłożono do przesuszenia. Niektóre próbki nie wykazywały zmian, inne rozpadały się w palcach i wymagały przemywania na bibule. Każda próbka została zarejestrowana, opisana i oddzielnie zapakowana. Ocenę stopnia zanieczyszczenia przeprowadzono dwojako: 1) opisano zmianę zabarwienia i wygląd włókna pod mikroskopem, sporządzając

Tabela I

Stopień zakażenia wełny drobnoustrojami

The degree of contamination of the wool with the microorganisms

Numer próby No of sample	Miejscowość Place from which wool sample was taken	Data pobrania próby Date of sampling	Numer ewidencyjny owcy No of the sheep	Rasa owcy Breed of the sheep	Ilość drobnoustrojów na 1 g wełny w mln. Number of microorganisms per 1 g of wool (in milions)
1	Kołuda W.	2 IV 1954 r.	106	Merynoprekos	38
2	„	„	107	„	40
3	„	„	150	„	37
4	„	„	155	„	27
5	„	„	9942	„	18
6	„	3 VII 1954 r.	106	„	83
7	„	„	107	„	22
8	„	„	150	„	110
9	„	„	155	„	30
10	„	„	9942	„	160
11	„	6 IX 1954 r.	106	„	40
12	„	„	107	„	60
13	„	„	150	„	80
14	„	„	155	„	36
15	„	„	9942	„	70
16	Mełno	29 IX 1954 r.	550	„	1046
17	„	„	626	„	900
18	„	„	739	„	37
19	„	„	987	„	339
20	„	„	18	Merynos × texel	155
21	„	„	21	„	150
22	„	„	78	„	38
23	„	„	86	„	20
24	Borowina	27 IX 1954 r.	72	Łowicka	145
25	„	„	81	„	61
26	„	„	195	„	131
27	„	„	206	Łowicka × texel	42
28	„	„	951	Świniarka × berichon × texel	56
29	Gągolin	2 X 1954 r.	894	Łowicka	1126
30	„	„	2764	„	794
31	„	„	2866	„	941
32	„	„	3056	„	1200
33	„	„	2855	„	269
34	„	„	3031	„	90
35	„	„	1504	„	44

Tabela I c.d.

Numer próby / No of sample	Miejscowość / Place from which wool sample was taken	Data pobrania próby / Date of sampling	Numer ewidencyjny owcy / No of the sheep	Rasa owcy / Breed of the sheep	Ilość drobnoustrojów na 1 g wełny w mln. / Number of microorganisms per 1 g of wool (in milions)
36	Gągolin	2 X 1954 r.	3021	Łowicka	97
37	„	„	58	Kent	1700
38	Stare Pole	19 X 1954 r.	69	Texel	1500
39	„	„	210	„	2060
40	„	„	330	„	1800
41	„	„	541	„	1800
42	„	„	550	„	826
43	Siejnik	22 X 1954 r.	134	Łowicka	1250
44	„	„	136	„	613
45	„	„	143	„	1776
46	„	„	277	Łowicka×Kent	1840
47	„	„	380	„	1690
48	Czechnica	10 X 1954 r.	53	Merynos	90
49	„	„	66	„	23
50	„	„	268	„	71
51	„	„	447	Pomorska	4
52	„	„	538	„	12,3
53	Grodziec	17 X 1954 r.	599	Nowa Górska	1,5
54	„	„	807	„	13,5
55	„	„	1355	„	13,3
56	„	„	1404	„	9,2
57	„	„	1461	„	15,0

w tym celu bezpośrednie preparaty mikroskopowe z włókien i ich odcisków w lakierze, 2) ustalono umownie pięciostopniową skalę:

zmiany niewidoczne 0,
zmiany słabo dostrzegalne 1,
zmiany dobrze dostrzegalne 2,
zmiany silne 3,
zmiany bardzo silne 4,
całkowite zniszczenie 5.

WYNIKI BADAŃ

Wyniki uzyskane przy oznaczaniu ilości drobnoustrojów na próbkach wełny pochodzącej z różnych owiec zestawiono w tabeli I.

Badania 57 jednostkowych próbek wełny, jak widać z wyników zestawionych w tabeli I, wykazują, że ilość drobnoustrojów żywych w wełnie owczej waha się w granicach od 4 milionów do 2 miliardów na 1 g wełny, w tym grzybków od 3 do 7 tysięcy (w 1 mg kału owiec znajduje się 20-165 milionów bakterii!).

Próbki wełny pobierane np. w Kołudzie w różnych porach roku wykazują różnice w ilości drobnoustrojów. Po zimie — wczesną wiosną — ilość drobnoustrojów wynosiła 18-40 milionów, w porze letniej 22-160 milionów, a w jesieni 36-80 milionów na 1 g wełny.

Zakażenie wełny drobnoustrojami pochodzi z powietrza, wody, gleby, ściółki itp., zależy więc zarówno od czynników klimatycznych, jak i pory roku, pogody, zanieczyszczenia wodopojów, pastwisk i owczarni. Dlatego też ilość drobnoustrojów przypadająca na 1 g wełny owiec w poszczególnych owczarniach można traktować jako ilustrację ich stanu sanitarnego.

CHARAKTERYSTYKA JAKOŚCIOWA MIKROFLORY WEŁNY NA OWCACH

Przez izolację poszczególnych kolonii bakterii i grzybków z posiewów dokonanych na różnych podłożach uzyskaliśmy ogromną ilość kultur drobnoustrojów, które należało zidentyfikować i przez odpowiednie zestawienie określić, które z nich najczęściej występują na wełnie.

Zestawiono tabelarycznie (na stołach) kilka tysięcy czystych szczepów kultur różniących się cechami morfologicznymi: w kierunku pionowym numery owiec (57 pozycji), w poziomym — numery szczepów (130 pozycji). Stwierdzono, że niektóre drobnoustroje powtarzają się we wszystkich próbach. Najliczniej reprezentowane w szeregach szczepy przyjęto jako przedstawicieli mikroflory wełny owczej, najczęściej zakażającej runo i te w dalszej części pracy przebadano pod względem zdolności ich do niszczenia wełny. Zaliczyliśmy tu 27 gatunków grzybów pleśniowych:

1. *Aspergillus niger v.* Tiegh
2. *Aspergillus niger v.* Tiegh (różniący się morfologicznie od poprzedniego)
3. *Aspergillus Wentii* Wehmer
4. *Aspergillus fumigatus* Fres
5. *Aspergillus glaucus* Link (*A. herbariorum* Wiggers Link)
6. *Aspergillus nidulans* Winter
7. *Aspergillus sp.*
8. *Mucor racemosus* Fresen
9. *Rhisopus nigricans* Ehrenb.
10. *Mucor circinelloides v.* Tiegh
11. *Mucor spinosus v.* Tiegh
12. *Alternaria tenuis* Nees

13. *Sordaria fimicola* (R o b e r g e)
14. *Cladosporium herbarum* (P e r s)
15. *Cladosporium graminum* C o r d a
16. *Trichothecium roseum* L i n k
17. *Acrostalagmus cinnabarinus* C o r d a (= *Verticillium cinnabarinum Corda*)
18. *Oospora sp.*
19. *Chaetostylum sp.*
20. *Thamnidium elegans* L i n k
21. *Chaetomium globosum* K u n z e
22. *Pestalozzia tumefaciens* H e n n
23. *Sepedonium sp.*
24. *Trichoderma lignorum* (T o d e)
25. *Stemphylium piriforme* B o n o r d
26. *Penicillium expansum* (L i n k) T h o m
27. *Penicillium sp.*

4 szczepy drożdżaków oznaczone w pracy od D_1 do D_4

3 szczepy promieniowców oznaczone od A_1 do A_3

22 szczepy bakterii tlenowych:

B_1 Pałeczki Gram —
B_2 Ziarniaki Gram —
B_3 Krótkie pałeczki Gram —
B_4 Ziarniaki Gram +
B_5 Ziarniaki Gram +
B_6 Sześcianki Gram +
B_7 Pałeczki nitkowate Gram +
B_8 Pałeczki Gram +
B_9 Pałeczki Gram +
B_{10} Ziarniaki Gram +
B_{11} Krótkie pałeczki Gram —
B_{12} Streptokoki Gram +
B_{13} Pałeczki Gram +
B_{14} Krótkie pałeczki Gram —
B_{15} Krótkie pałeczki Gram —
B_{16} Pałeczki Gram +
B_{17} Ziarniaki Gram —
B_{18} Ziarniaki Gram —
B_{19} Pałeczki Gram +
B_{20} Pałeczki Gram +
B_{21} Ziarniaki Gram +
B_{22} Pałeczki Gram +

Przeprowadzone badania mikrobiologiczne próbek wełny wykazują, że wełna na owcy, zależnie od warunków sanitarnych owczarni, nosi większe lub mniejsze zakażenie charakterystycznymi dla środowiska typami drobnoustrojów. O dominowaniu takich czy innych grup decydują warunki ekologiczne. Przy wszelkiego rodzaju zanieczyszczeniach wełny wzrostowi bakterii sprzyja reakcja alkaliczna, zakwaszenie zaś umożliwia wzrost grzybków.

Wysokość zakażenia nosi cechy przypadkowości, charakter drobnoustrojów jest dość wyrównany — typowa mikroflora nawozów i gnijących resztek roślinnych.

Zestawienie gatunków oznaczonej przez nas mikroflory wełny na owcy z podawanymi w literaturze spisami drobnoustrojów (P a r t r i d g e

1949, Puig 1950, Lee 1950, Marsch 1950, Sen-Gupta 1950) uznanych za niszczycielskie dla artykułów tekstylnych wskazuje, że zakażenie wełny na owcy przenosi się do magazynów i zdolne jest przetrwać tok wytwórczy, fabryczny, ujawnić się w półfabrykacie a nawet nieraz w gotowym artykule (Garner 1949, Galloway 1940).

OCENA NISZCZYCIELSKIEJ DZIAŁALNOŚCI MIKROFLORY WEŁNY

Drobnoustroje uznane przez nas za najczęściej występujące na wełnie owcy zostały zbadane pod względem zdolności do niszczenia włókna wełny. Wyniki zebrano w tabeli II. Numeracja drobnoustrojów została utrzymana jak w spisie.

Obraz mikroskopowy wełny ulegającej zniszczeniu pod wpływem niektórych drobnoustrojów jest przedstawiony w tabelach VI i VII.

Procesy wywołane w warunkach laboratoryjnych dały w efekcie obraz zniszczenia, jakiemu może ulec wełna w optymalnych warunkach rozwoju drobnoustrojów, przy dużej infekcji wstępnej.

Ocenę zniszczenia wełny możemy prowadzić według kryteriów stosowanych w laboratoriach przemysłowych i badawczych. Opierają się one bądź na ocenie optycznej: zmiana koloru, zbicie, kruszenie się, fibrilizacja — dokonywanej okiem nie uzbrojonym lub przy pomocy mikroskopu, bądź też na ocenie zmian mocy włókna, jego sprężystości, rozciągliwości itp. — dokonywanej przy pomocy odpowiednich aparatów (Whewel 1951, Sieber 1928, Mandels 1948 i inni).

Wobec tego, że zniszczenie próbek wełny poddanych działaniu drobnoustrojów w naszych badaniach było optycznie ocenialne, a w dostępie do aparatury napotkaliśmy na techniczne trudności, poprzestaliśmy na makro- i mikroskopowej ich analizie, z której uzyskaliśmy następujące wyniki:

Spośród 31 szczepów przebadanych grzybków, w tym 4 szczepy drożdży, 3 szczepy promieniowców i 22 szczepy bakterii, biochemicznie nieaktywne w stosunku do włókna wełny okazały się jedynie drożdże. Najsilniej niszczyły wełnę: *Stemphyllium* (tab. II, fot. 1), *Cladosporium* (tab. II, fot 2), *Chaetomium* (tab. III, fot. 1), *Sordaria* (tab. III, fot. 2), *Trichoderma* (tab. IV, fot. 1), potem *Alternaria*, *Penicillium*, *Pestalozzia*, *Oospora*. Z promieniowców szczep A_{13} (*Streptomyces albus* Welsch (tab. IV, fot. 2), z bakterii szczepy B_1 (typ *Proteus*), B_8, B_{19} (typ *subtilis* (tab. V, fot. 1), B_{20} (typ *B brevis*, tab. V, fot. 2).

W zestawieniu 4 wziętych do badań typów wełny najodporniejsza okazała się „mieszanka krajowa", najmniej odporna wełna merynosowa (tablice II-V).

Tabela II

Niszczenie próbek wełny przez drobnoustroje
Deterioration of the wool caused by microorganisms

Nr drobnoustroju No of micro-organisms	Gatunek wełny Sort of wool	Zabarwienie Colour	Kruchość,* odpadanie łusek Fragility	Preparat** mikroskopowy włókna Microscopical examination	Stopień zniszczenia Degree of deterioration
Próba kontrolna Control	I, II, III, IV	—	—	—	0
1	I	—	—	—	0
	II, III, IV	zielonkawe — greenish	—	—	1
2	I	—	—	—	0
	II, III	zielonkawe — greenish	—	—	1
	IV	zielono-brunatne green-brown	+	—	2
3	I, II, III	—	—	—	0
	IV	lekko zmienione slightly changed	—	—	1
4	I	—	—	—	0
	II	siwo-zielone grey-green	—	—	2
	III	wybielała — whitened	+	+	3
	IV	lekko zmienione slightly changed	—	—	1
5	I, II	—	—	—	0
	III	żółtawe — yellowish	—	—	1
	IV	lekko zmienione slightly changed	—	—	1
6	I	pomarańczowo-żółte orange-yellow	—	—	2
	II	lekko zmienione slightly changed	—	—	2
	III	„	+	+	3
	IV	brunatno-pomarańczowe brown-orange	—	—	2
7	I				0
	II	lekko zmienione slightly changed	+	+	2
	III	zmienione — changed	+	+	3
	IV	zmienione — changed	—	—	2
8	I, IV	zmienione — changed	—	—	2
	II, III	zmienione — changed	+	+	3

Nr drobnoustroju No of micro-organisms	Gatunek wełny Sort of wool	Zabarwienie Colour	Kruchość, odpadanie łusek Fragility	Preparat mikroskopowy włókna Microscopical examination	Stopień zniszczenia Degree of deterioration
9	I, II	lekko zmienione slightly changed		—	1
	III, IV	lekko zmienione slightly changed		+	2
10	I, II, III	—		—	0
	IV	lekko zmienione slightly changed		—	1
11	I, II	—			0
	III, IV	lekko zmienione slightly changed		—	1
12	I	zmienione — changed		+	5
	II	lekko zmienione slightly changed		+	3
	III	zmienione — changed		+	5
	IV	zmienione — changed		+	4
13	I	—		—	0
	II, III, IV	zmienione — changed		+	5
14	I	lekko zmienione slightly changed		+	1
	II, III, IV	bardzo zmienione strongly changed		+	5
15	I	lekko zmienione slightly changed		+	4
	II, III, IV	lekko zmienione slightly changed		+	5
16	I	—		—	0
	II	lekko zmienione slightly changed		+	4
	III, IV	lekko zmienione slightly changed		+	3
17	I	—		—	0
	II	rude — reddish		—	2
	III, IV	żółto-rude yellow-reddish		—	2
18	I			—	0
	II, III, IV	lekko-zmienione slightly changed		+	4
19	I, II	—		—	0
	III, IV	lekko zmienione slightly changed		—	1

Nr drobnoustroju No of micro-organisms	Gatunek wełny Sort of wool	Zabarwienie Colour	Kruchość, odpadanie łusek Fragility	Preparat mikroskopowy włókna Microscopical examination	Stopień zniszczenia Degree of deterioration
20	I	lekko zmienione slightly changed	−	−	1
	II, III, IV	—	−	−	0
21	I	lekko zmienione slightly changed	−	−	1
	II, III, IV	zmienione — changed	+	+	5
22	I	lekko zmienione slightly changed	+	+	2
	II, III	lekko zmienione slightly changed	+	+	3
	IV	lekko zmienione slightly changed	+	+	4
23	I, II, III, IV	lekko zmienione slightly changed	+	+	4
24	I, II, III, IV	lekko zmienione slightly changed	+	+	4
25	I	lekko zmienione slightly changed	+	+	4
	II, III, IV	lekko zmienione slightly changed	+	+	5
26	I, II	lekko zmienione slightly changed	+	+	4
	III	lekko zmienione slightly changed	+	+	1
	IV	lekko zmienione slightly changed	+	+	2
27	I	lekko zmienione slightly changed	+	+	3
	II	„	+	+	2
	III, IV	„	+	+	4
A_1	I	—	−	−	0
	II	—	+	+	2
	III, IV	—	+	+	3
A_2	I, II, III	—	−	−	0
	IV	—	+	+	3
A_3	I, II, III, IV	—	+	+	5
B_1	I	—	+	+	4
	II	—	+	−	5
	III, IV	—	+	+	4

Nr drobnoustroju N° of micro-organisms	Gatunek wełny Sort of wool	Zabarwienie Colour	Kruchość, odpadanie łusek Fragility	Preparat mikroskopowy włókna Microscopical examination	Stopień zniszczenia Degree of deterioration
	I	—	+	+	2
B_2	II	—	+	+	3
	III	—	—	—	0
	IV	—	+	+	4
B_3	I, II, III	—	—	—	0
	IV	—	+	+	4
B_4	I, II, III, IV	—	+	+	3
B_5	I, II, III	—	+	+	3
	IV	—	+	+	4
B_6	I, II, III	—	—	—	0
	IV	—	—	+	1
B_7	I, II, III	—	—	—	0
	IV	—	+	+	2
B_8	I	—	+	+	4
	II, III, IV	—	+	+	5
B_9	I, II, III	—	—	—	0
	IV	—	—	+	1
B_{10}	I, II, III	—	—	—	0
	IV	—	+	+	3
B_{11}	I, II, III	—	—	—	0
	IV	lekkie ściemnienie slightly darkened	—	+	3
B_{12}	I	—	—	—	0
	II	—	+	+	4
	III, IV	—	+	+	3
B_{13}	I, II, III	—	—	—	0
	IV	—	+	+	3
B_{14}	I, II, III	—	—	—	0
	IV	—	+	+	3
B_{15}	I, II, III	—	—	—	0
	IV	—	+	+	4
B_{16}	I, III, IV	—	—	—	0
	II	—	—	+	2
B_{17}	I, II	—	—	—	0
	III	—	+	+	4
	IV	—	+	+	3
B_{18}	I	—	+	+	4
	II, III, IV	—	+	+	3

Nr drobnoustroju No of micro-organisms	Gatunek wełny Sort of wool	Zabarwienie Colour	Kruchość, odpadanie łusek Fragility	Preparat mikroskopowy włókna Microscopical examination	Stopień zniszczenia Degree of deterioration
B_{19}	I, II	—	+	+	5
	III, IV	—	+	+	4
B_{20}	I, II, III, IV	—	+	+	5
B_{21}	I, II, III	—	—	—	0
	IV	—	—	+	3
B_{22}	I, III	—	—	—	0
	II, IV	—	—	+	2
D_1	I, II, III, IV	—	—	—	0
D_2	I, II, III, IV	—	—	—	0
D_3	I, II, III, IV	—	—	—	0
D_4	I, II, III, IV	—	—	—	0

* Kruchość, odpadanie łusek okiem nieuzbrojonym: widoczne +, niewidoczne —
** W preparacie mikroskopowym zniszczenie włókna: widoczne +, niewidoczne —

Zestawienie podatności wełny „krzyżówka krajowa" pranej z nie praną wykazała, że proces prania ułatwia mikroorganizmom niszczenie włókna (próbki II i III na tablicach II-V).

W poszczególnych wypadkach wystąpiła wybitna zmiana zabarwienia próbek wełny bez widocznych zmian histologicznych.

* * *

Przeprowadzone przez nas badania nad mikrobiologicznym psuciem wełny owczej dają się zreasumować w następujących wnioskach:

1. W skład mikroflory wełny owiec wchodzą bardzo liczne drobnoustroje, zarówno grzyby, promieniowce, jak i bakterie, które są zdolne w odpowiednich warunkach prowadzić degradację wełny posuniętą niekiedy do całkowitej jej fibrilizacji.

2. Mikroflora wełny na owcy jest typową mikroflorą nawozu i gnijących resztek roślinnych. Do najsilniej niszczących wełnę zaliczyliśmy drobnoustroje: *Stemphyllium, Cladosporium, Chaetomium, Sordaria, Trichoderma*, potem *Alternaria, Penicillium, Pestalozzia, Oospora.* Z promieniowców *Streptomyces*, z bakterii: *Proteus, B. subtilis, B. brevis.*

3. Wysokość zakażenia wełny na owcy leży w granicach od 4 milionów do 2 miliardów żywych drobnoustrojów w 1 g wełny i nosi charakter przypadkowości.

4. Drobnoustroje wchodzące w skład mikroflory wełny na owcy są zdolne przetrwać procesy technologiczne jakim poddawana jest wełna w obróbce przemysłowej, czego dowodem jest stwierdzenie na wełnie fabrycznej i na gotowych fabrykatach wełnianych tych samych typów drobnoustrojów jakie powszechnie występują na wełnie na owcy.

Wszystko to nasuwa wniosek ogólny, że walkę z drobnoustrojowym niszczeniem wełny należy rozpocząć w owczarni, a runo po strzyży dezynfekować środkami grzybo- i bakterio-bójczymi, ażeby zakażenia nie przenosić do magazynów i fabryk.

LITERATURA

Bergey, Mannual of Determinative Bacteriology, Baltimore 1948.

Brussof A., 1933: Bacterien als Verursacher der Stockflecken on Baumwollgarnen. *Melliand Textilberichte*. 14.

Burgess R., 1924: Studies on the bacteriology and mycology of wool. *J. Text. Inst.* **15**: 573—583.

Burgess R., 1928: A contribution to the study of the microbiology of wool. *J. Text. Inst.* **19**: 315-322.

Burgess R., 1929: Further studies on the microbiology of wool. The enchancement of „mildew" by soaps and vegetable oils. *J. Text. Inst.* **20**: 33—372.

Burgess R., 1931: Factors effecting the development of mildew on wool. *Dyers and Col. J.* **47**: 96.

Burnthall E. V., 1952: Rozpad wełny pod wpływem mikroorganizmów. *Text. J. Austr.* **27**: 6.

Corda A. C., 1837-1854: Icones fungorum hucusque cognitorum. Prague.

Doehner H., 1954: Hanbuch der Schafzuchtung und Schafhaltung.

Galloway L. D. and Burgess R., 1940: Applied Mycology and Bacteriology. London.

Garner W., 1949: Textile Laboratory Mannual. Bungay. Suffolk.

Heinrici A. T., 1930: Molds, Yeasts and Actinomycetes. New York.

Humfeld H., Elmquist R. E. and Kettering J. H., 1937: The sterilisation of wool and its effects on physical and chemical properties of wool fabric. *U. S. Dep. Agr. Techn. Bull.* 588.

Krasilnikow N. A., 1949: Opriedielitiel baktierij i actinomycetow. Moskwa — Leningrad.

Kudriawcew W., 1954: Sistiematika drożdżej. Moskwa.

Kuzniecow T. I., 1950: Szerstowiedienije. Moskwa.

Lafar F., 1904-1914: Handbuch der technischen Mycologie. Jena.

Lee S., 1950: Laundry resistant antymildew treatment. *Am. Dyest. Rep.* **39**: 5.

Lembke A., 1943: Ergebnisse der theoretischen und angewandten Mikrobiologie. Bd. I, Systematik der Schimmelpilze. Kiel.

Lindau G., 1922: Kryptogamenflora für Anfänger. Bd. II, 1, 2. Die mikroskopischen Pilze.

Maerz A. and Paul R. M., 1950: Dictionary of Color. New York. Toronto. London.

Marsch P. B. and Ballenbacher K., 1950: The fungi concerned in fiber deterioration. I. Their occurence. *J. Test. Inst.* **41**: 22.

Mandels G. R., 1948: Structural changes in wool degraded by the ringworm fungus *Microsporum gypseum* and other microorganisms. *Text. Res. J.* **18**: 4.

Meeuse A. D., Hietink H. A. J. and Gorten J., 1950: The examination of damage in wool. W tłumaczeniu polskim Weintrauba i Cichowskiego. Łódź.
Moore W. R., 1953: The structure and properties of natural and allied fibres. *J. Soc. Dyers and Col.* **69**: 149.
Partridge H. W., 1949: Rotproofing. *J. Text. Inst.* **70**: 12.
Prescott S. C. and Dunn G. G., 1940: Industrial Microbiology. New York.
Prescott S. C. and Dunn G. G., 1940: Methylene Blue adsorption as a Quantitative Measure of Wool Damage. *Text. Res.* **5**.
Prindle B., 1935: The Microbiology of Textil Fibres. *IV Raw Wool. Text. Res.* **6**: 23.
Puig J. B., 1950: Degradation phenomene in wool. *Am. Dyest. Rep.* **11**, 2: 44.
Rabenhorst L., 1904-1910: Kryptogamenflora von Deutschland, Oesterreich und Schweiz. B. I. Val. **4**: 8. Leipzig.
Race E., 1946: Symposium of Fibrous Proteine. *Pub. Soc. of Dyers and Col.*
Sen Gupta S. R., 1950: A new wool destroing fungus. *Ctenomyces. sp. Text Res. J. XX.* **10**: 671.
Sieber W., 1928: Eine Prüfungsmethode für Wollfäserschädigungen. *Melliand Textilber.* **9**.
Skirgiełło A., 1954: Grzyby niższe. PWN. Warszawa.
Smith G., 1947: Industrial Mycology. London.
Stoves J. E., 1952: Laboratoryjne metody w przemyśle wełniarskim. *Text. Ind. Fibres.* **13**: 7.
Thom C. and Church M. B., 1920: The Aspergilli. Baltimore.
Whewell C. S., 1951: The Assessment of Damage in Wool Material. *Text. Res.* **68**: 814.
White W. L., Mandels G. R. and Siu R. G. H., 1950: Fungi relation to the degradation of woolen fabrics. *Mycologia.* **425**: 199.
Zycha H., 1935: Kryptogamenflora der Mark Brandenburg. Bd. VIa. Pilze II. *Mucorinae.* Leipzig.

I. Michalska

FUNGI AND BACTERIA AS A FACTOR IN DECAYING OF WOOL-FIBER

Summary

The aim of present research was qualitative and quantitative examination of microflora of sheep fleece and the role of isolated microorganisms in destroying wool-fibers.

The research was conducted during 1954 and 1955 years. The material was collected from 8 flocks in various parts of the country. The fleece of sheep of 12 various breeds was examined.

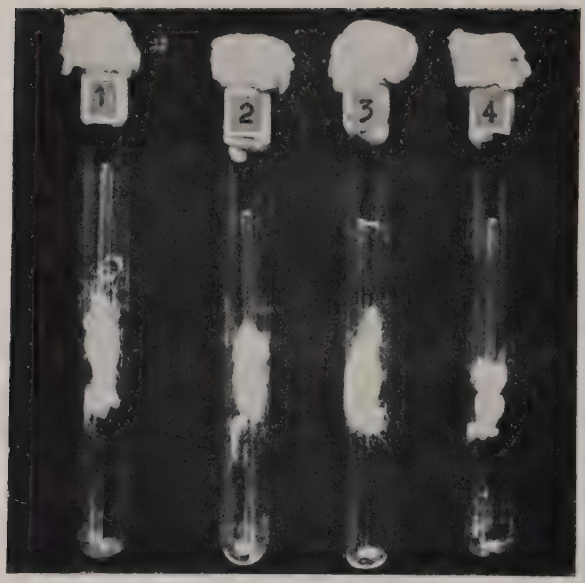
Up to $4 \cdot 10^6$—$2 \cdot 10^9$ microorganisms per 1 g wool were found.

The microflora of the fleece was not specific. The majority of bacteria, actinomycetes and fungi found on wool were typical for microflora of dung and decaying plant-tissues.

Further, the wool-destroying activity of isolated microbes was examined. In this respect the most active were following genera: Fungi: *Stemphyllium, Cladosporium, Chaetomium, Sordaria, Trichoderma, Alternaria, Penicillium, Pestalozzia, Oospora; Streptomyces sp.;* bacteria: *Proteus, Bacillus* (*B. subtilis* and *B. brevis*).

Fot. 1. 100-miligramowe próbki wełny: *I* — mieszanka krajowa, *II* — krajowa krzyżówka nieprana, *III* — krajowa krzyżówka prana, *IV* — merynosowa

Phot. 1. Wool samples (100 mg): *I* — Local „mixed", *II* — Local „crossed" unwashed, *III* — Local „crossed", washed, *IV* — Merino



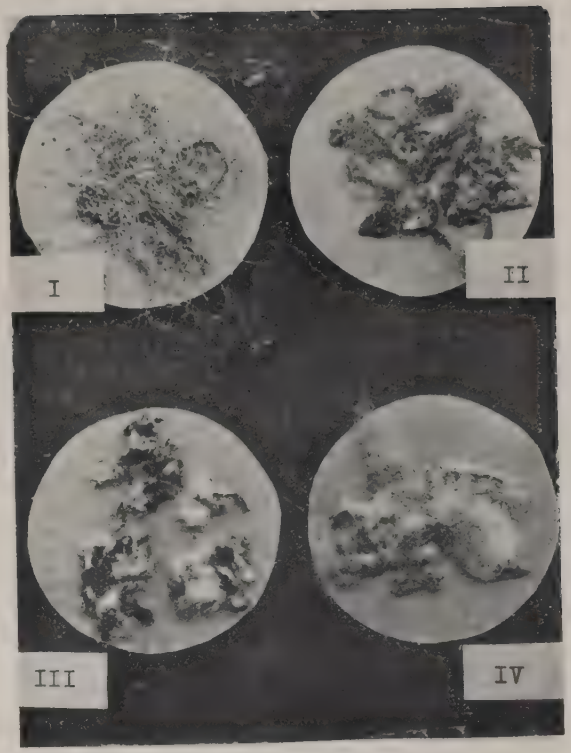
Fot. 2. Probówki z wyjałowionymi próbkami wełny przygotowanymi do posiewu

Phot. 2. Sterelised wool samples

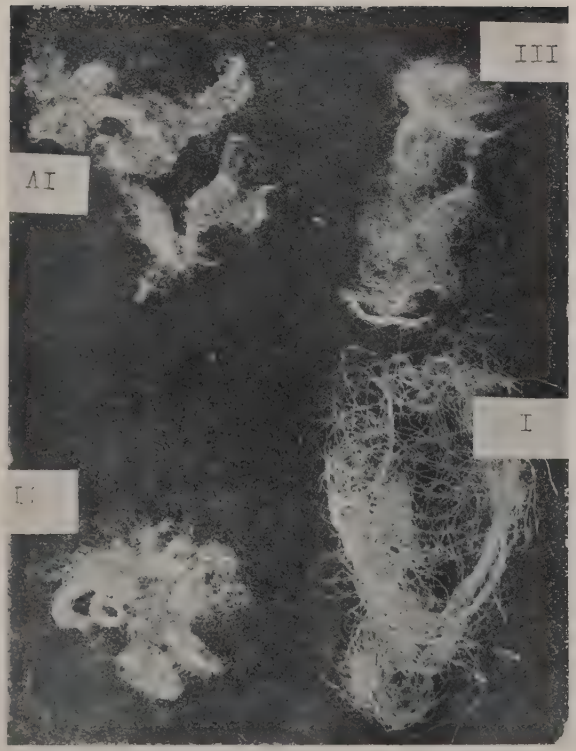
Fot. 3. Wzrost drobnoustrojów na próbkach wełny: *1 — B. subtilis, 2 — A. niger*

Phot. 3. Growth of microorganisms on wool samples: *1 — B. subtilis, 2 — A. niger*

Fot. 1. Próbki wełny zniszczone przez *Stemphylium*
Phot. 1. Wool samples destroyed by *Stemphylium*

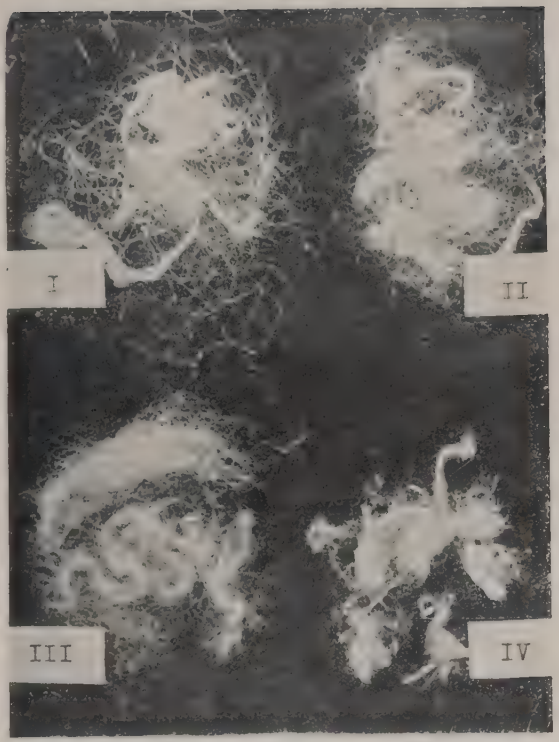


Fot. 2. Próbki wełny zniszczone przez *Cladosporium*
Phot. 2. Wool samples destroyed by *Cladosporium*



Fot. 1. Próbki wełny zniszczone przez *Chaetomium*
Phot. 1. Wool samples destroyed by *Chaetomium*

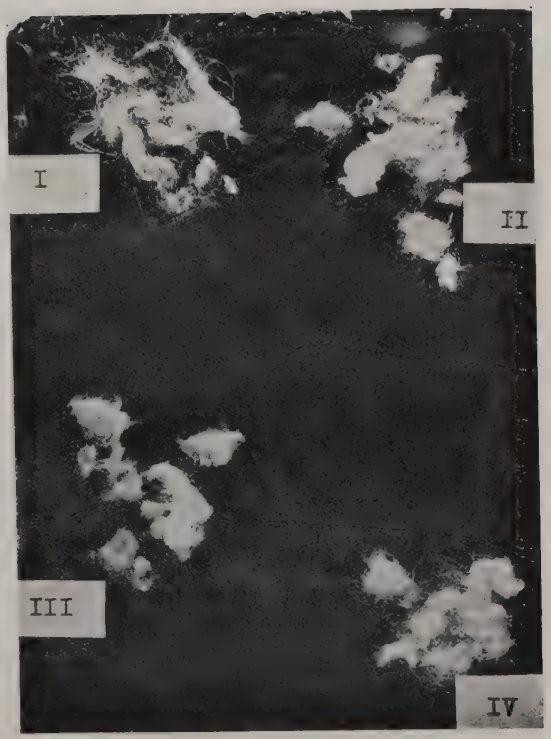
Fot. 2. Próbki wełny zniszczone przez *Sordaria*
Phot. 2. Wool samples destroyed by *Sordaria*



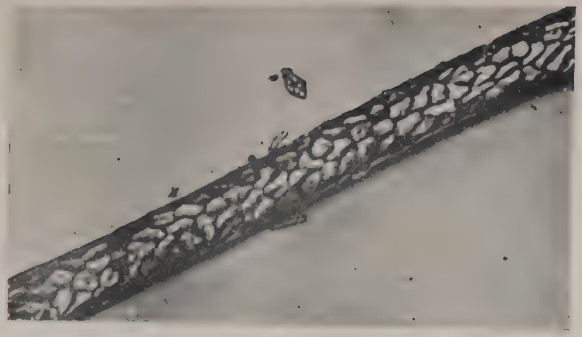
Fot. 1. Próbki wełny zniszczone przez *Trichoderma*
Phot. 1. Wool samples destroyed by *Trichoderma*

Fot. 2. Próbki wełny zniszczone przez *Streptomyces*
Phot. 2. Wool samples destroyed by *Streptomyces*

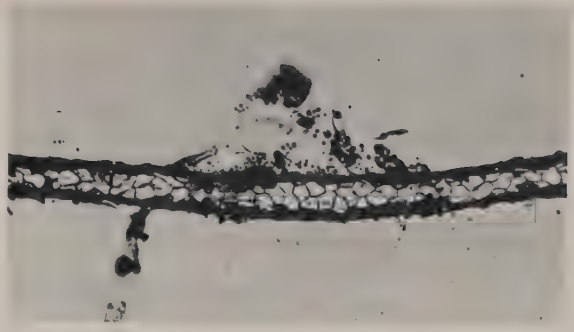
Fot. 1. Próbki wełny zniszczone przez *B. subtilis*
Phot. 1. Wool samples destroyed by *B. subtilis*



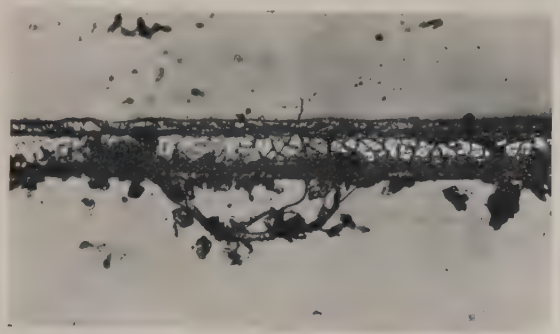
Fot. 2. Próbki wełny zniszczone przez *B. brevis*
Phot. 2. Wool samples destroyed by *B. brevis*



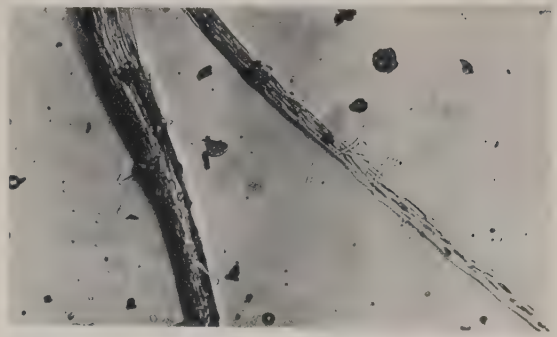
Fot. 1. Słaby opad łusek powodowany przez *A. niger*
Phot. 1. The partial decomposition of wool fibers caused by *A. niger*



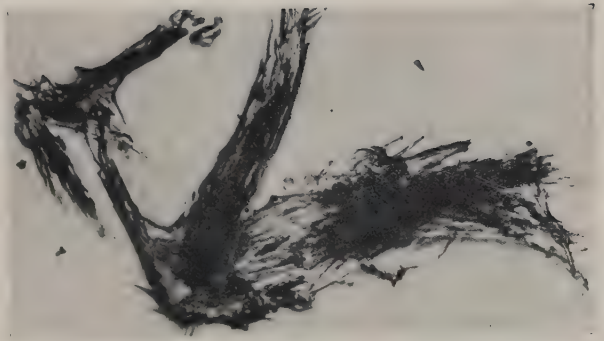
Fot. 2. Wzrost *A. niger* na wełnie
Phot. 2. Growth of *A. niger* on wool fibers



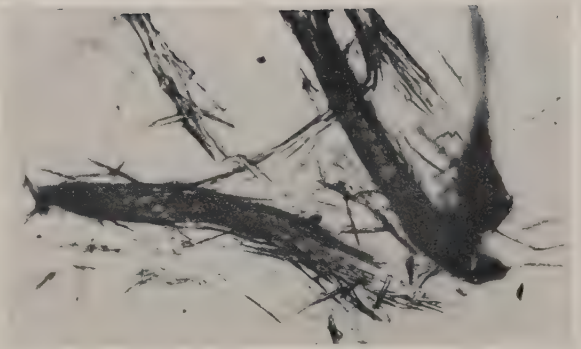
Fot. 3. Opadanie łusek powodowane przez *Penicillium sp.*
Phot. 3. Partial decomposition of wool fibers caused by *Penicillium sp.*



Fot. 4. Całkowity opad łusek i niszczenie kory przez *Trichothecium*
Phot. 4. Decomposition of wool fibers caused by *Trichothecium*

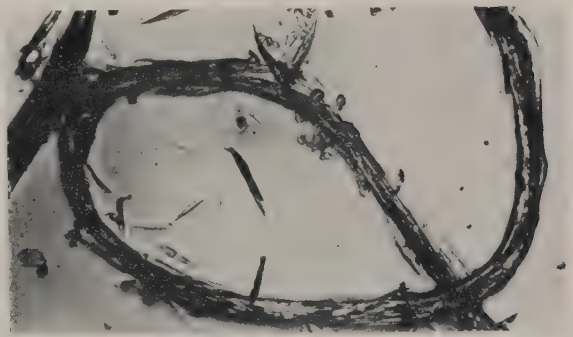


Fot. 1. Zniszczenie wełny przez *Stemphyllium*
Phot. 1. Decomposition of wool fibers caused by *Stemphyllium*



Fot. 2. Zniszczenie wełny przez *Actinomycetes*
Phot. 2. Decomposition of wool fibers caused by *Actinomycetes*

Fot. 3. Zniszczenie wełny przez *B. subtilis*
Phot. 3. Decomposition of wool fibers caused by *B. subtilis*



Fot. 4. Zniszczenie wełny przez *Proteus*
Phot. 4. Decomposition of wool fibers caused by *Proteus*

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1957, 6, 189-206

J. Górzyńska

POSZUKIWANIA NOWYCH RAS DROŻDŻY NA DRODZE HYBRYDYZACJI

Z Instytutu Przemysłu Fermentacyjnego w Warszawie

Wpłynęło dnia 13 czerwca 1956 r.

Krzyżowanie organizmów roślinnych i zwierzęcych jest dawno znaną metodą uzyskiwania nowych odmian. W odniesieniu do drożdży dała ona również dobre rezultaty.

K o s i k o w (1951) tak pisze na ten temat: „Mieszańce są to organizmy heterozygotyczne, które mają większe możliwości rozwoju i przystosowania się niż ich rodzice. Charakteryzują się one rozchwianą dziedzicznością, a więc łatwiej można je przystosować do żądanych warunków".

Sztuczne krzyżowanie drożdży opiera się na zdolności niektórych rodzajów do wytwarzania zarodników, które mogą rozwijać się na drodze płciowej po uprzedniej kopulacji czyli fuzji.

ROZMNAŻANIE PŁCIOWE DROŻDŻY

Rozmnażanie płciowe drożdży polega na kopulacji zarodników powstających w komórkach przekształconych w worki. W niektórych rodzajach tworzenie się worków poprzedza proces płciowy zlewania się dwóch komórek. Częściej jednak (u rodzaju *Saccharomyces*) worki tworzą się partenogenetycznie (W i n g e 1935).

Podczas wytwarzania zarodników zachodzi normalny podział redukcyjny jądra, co zostało już stwierdzone przez L u t m a n a (1929), a następnie szczegółowo opisane przez B a d i a n a (1937) oraz L i e t z a (1952). Prace tych badaczy, jak również Wingego i Laustsena (W i n g e 1935), wykazały, że drożdże mogą występować w haplo- i diplofazie.

Liczba chromosomów w jądrach komórkowych drożdży nie została jeszcze ustalona, gdyż zdania uczonych w tej kwestii są podzielone.

W 1905 roku Swellengrebel, a w 1906 Fuhrman zaobserwowali w jądrze drożdży figury mitotyczne z czterema chromosomami (według Wingego 1935). Według Badiana (1937) jądro komórki drożdżowej składa się z dwóch chromosomów, które w jądrze spoczynkowym są wygięte w formie łuku. Podział odbywa się drogą prymitywnej formy mitozy. Polega on na podłużnym podziale chromosomów, które następnie oddalają się od siebie parami, po czym jedna para przechodzi do tworzącego się pączka, druga zaś zostaje w komórce macierzystej.

Przed tworzeniem się zarodników zachodzi u drożdży redukcja chromosomów i w wyniku podwójnego podziału jądra zawierającego 2 biwalentne chromosomy powstają 4 zarodniki, których jądra posiadają po 2 chromosomy. Powstanie w worku mniej niż 4 spor tłumaczy się zamieraniem pojedynczych komórek potomnych podczas I lub II podziału redukcyjnego.

Wszystkie zarodniki są formami haploidalnymi.

Diplofaza zaczyna się od momentu kopulacji zarodników lub ich komórek potomnych. Od tego momentu wszystkie komórki powstałe przez pączkowanie stanowią diplofazę, aż do momentu nowego podziału redukcyjnego. Podczas kopulacji zarodników (ewentualnie wegetatywnych komórek haploidalnych) następuje zlewanie się chromosomów po dwa, w wyniku czego jądro diploidalne komórki wegetatywnej zawiera taką samą ilość chromosomów co jądro haploidalnej spory, z tym że w pierwszym przypadku mamy do czynienia z dwoma chromosomami biwalentnymi, a w drugim z dwoma uniwalentnymi.

Winge (1951) stwierdza, że obserwował po 2 ciałka chromatynowe w diplo- i haplofazie, jakkolwiek w niektórych wypadkach spotykał u form diploidalnych 4 ciałka chromatynowe.

Całkowicie odmienne wyniki uzyskał Lietz (1952). Obserwował on podziały mitotyczne jąder komórek diploidalnych, przy czym stwierdził w płytce metafazowej obecność 6 chromosomów. Podziały jądrowe w komórkach haploidalnych przebiegają według niego analogicznie jak w diploidalnych, jednak jądra haploidalne są mniejsze i zawierają 3 chromosomy. Odnośnie powstawania zarodników badania Lietza pokrywają się całkowicie z omówionymi wyżej wynikami prac Badiana (1937) oraz Wingego (1935) i Kosikowa (1948).

Rozmnażanie zarodników opisali Winge i Laustsen (1937). Stwierdzili oni, że zarodniki mogą rozwijać się dwojako: czasem wytwarzają komórki typu haploidalnego, które charakteryzują się tym, że są drobne, okrągłe i tworzą zbite kolonie z kilkunastu komórek, czasem zaś tworzą komórki typu diploidalnego, które są wydłużone i większe od haploidalnych.

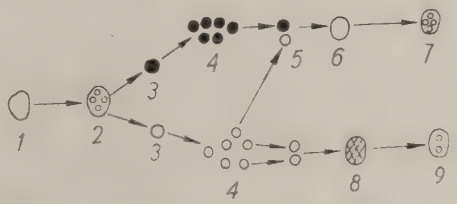
Zdarza się, że z 4 wyizolowanych z jednego worka zarodników dwa wytwarzają komórki okrągłe, a dwa wydłużone. Czasem znów trzy rozmnażają się pierwszym sposobem a jeden drugim — i odwrotnie.

Różnica w wyglądzie i sposobie wzrostu komórek musi polegać na różnicy faz, dziwny jednak wydaje się fakt, że haploidalna, jednojądrowa spora zdolna jest do produkowania komórek diploidalnych. Poza tym niemożliwe jest, aby spośród czterech zarodników jeden mógł być diploidalny.

Jedynym wytłumaczeniem wytwarzania przez askosporę komórek wydłużonych może być to, że między komórką macierzystą a potomną w momencie jej powstawania musi zajść zlewanie się jąder, czyli stadium diploidyzacji. Czasem dwa zarodniki koniugują ze sobą tworząc zygotę, która z kolei wytwarza wydłużone komórki diploidalne.

W przypadku rozmnażania się pojedynczej spory w kolonię wegetatywnych komórek haploidalnych między poszczególnymi komórkami tej kolonii może zachodzić kopulacja. Powstałe zygoty rozmnażając się produkują komórki diploidalne o charakterystycznych wydłużonych kształtach.

Znane są szczepy drożdży, u których diploidyzacja zachodzi bardzo często, a tym samym występują one rzadko w stanie haploidalnym (np. *Saccharomyces italicus*).



Rys. 1. Schemat zarodnikowania drożdży. *1* — normalna komórka diploidalna, *2* — worek, *3* — zarodnik, *4* — komórki haploidalne, *5* — prawidłowa kopulacja, *6* — prawidłowa komórka diploidalna, *7* — worek czterozarodnikowy, *8* — nieprawidłowa komórka diploidalna, *9* — worek ze zredukowaną liczbą zarodników (nieżywotnych)

Komórki diploidalne wytwarzają zarodniki bezpośrednio po ich umieszczeniu na bloku gipsowym. Komórki haploidalne należy najpierw umieścić w środowisku odżywczym (np. brzeczka), gdzie tworzą zygoty rozmnażające się wegetatywnie w wydłużone komórki diploidalne, które następnie po przeniesieniu na blok gipsowy wytwarzają spory.

Całkowicie odmienny pogląd na zarodnikowanie drożdży wyraża Lindegren (1949). Według niego worki czterozarodnikowe powstają w wyniku „prawidłowej" (*legitimate*) kopulacji komórek, to znaczy komórek pochodzących od różnych zarodników (rys. 1).

W wyniku kopulacji komórek pochodzących od tej samej spory powstają worki o zredukowanej liczbie zarodników (kopulacja „nieprawidłowa" — *illegitimate*), przy czym zarodniki te nie są zdolne do rozwoju.

Pogląd Lindegrena krytykował Winge (W i n g e and R o b e r t s 1948) oraz K o s i k o w (1948a), którzy stwierdzili doświadczalnie, że żywotność spor nie stoi w związku z tym, z jakiego worka one pochodzą (dwu-, trzy- czy czterozarodnikowego).

METODYKA KRZYŻOWANIA

Sztuczne krzyżowanie drożdży polega na uzyskaniu kopulacji komórek pochodzących od różnych szczepów. W wypadku gdy kopulacja zajdzie, tworzy się zygota. Jeśli ta ostatnia rozmnoży się dalej przez pączkowanie — otrzymujemy mieszańca.

Pierwsze pozytywne wyniki prac z dziedziny krzyżowania drożdży ogłosił w roku 1935 uczony duński W i n g e (1935). W badaniach swych, prowadzonych wspólnie z Laustsenem, oparł się na zdolności do zarodnikowania drożdży z rodzaju *Saccharomyces*. Wyodrębnianie zarodników prowadził przy pomocy dwóch szklanych igieł, z których jedna miała zakończenie grubości około 2,5 μ, a druga 7 μ. Ruchy igieł osiągał stosując mikromanipulator. Zarodniki były następnie umieszczane w wilgotnych kamerach, po 2 zarodniki z różnych szczepów, w jednej kropli pożywki, gdzie kopulowały i dawały początek nowym szczepom.

W Stanach Zjednoczonych krzyżowaniem drożdży zajmowali się małżonkowie Lindegren. Ich metoda polega na krzyżowaniu całych kolonii haploidalnych, z których każda wyrosła z pojedynczej spory (L i n d e g r e n 1949). Pewna ilość komórek z tych kolonii zmieszana ze sobą w odpowiednim środowisku łączy się, dając początek diploidalnym komórkom mieszańca. Komórki te, jako większe od haploidalnych, łatwo można odróżnić i oddzielić od pozostałych w celu dalszego rozmnożenia.

W Związku Radzieckim prace nad hybrydyzacją drożdży prowadzone są przez K. W. Kosikowa. Kosikow oparł się w swej pracy na metodzie Wingego, wprowadzając do niej pewne modyfikacje. Między innymi zastosował do rozrywania worków haczyk zamiast grubszej igły stosowanej przez Wingego. Haczyk ten służy do nagniatania na cienką igłę w wypadku, gdy worek nie poddaje się przepiłowaniu.

Odmienną technikę krzyżowania drożdży zastosował Shih-Yi-Chen. Metoda jego jest do pewnego stopnia syntezą metody Wingego i Lindegrena (S h i h - Y i - C h e n 1950). Do krzyżowania bierze się dwie haploidalne kolonie drożdży o znakach przeciwnych (heterotallizm). Kultury te przeszczepia się co najmniej raz do świeżego środowiska płynnego. Następnie z każdej kultury bierze się jedną kroplę i umieszcza się na szkiełku nakrywkowym w kamerze Wingego, obok kilku kropel pożywki. Przy pomocy mikromanipulatora izoluje się po jednej komórce bez pączków z każdej kultury drożdży i umieszcza się je parami obok siebie w kroplach pożywki. Kopulację obserwuje się pod mikroskopem po 2-6 godzin.

DZIEDZICZENIE CECH MORFOLOGICZNYCH I FIZJOLOGICZNYCH

Cechy morfologiczne komórek mieszańca są na ogół pośrednie między cechami form rodzicielskich. Czasem jednak zdarzają się odchylenia od tej reguły.

Winge i Laustsen (1939) krzyżując *Saccharomyces ellipsoideus* o komórkach elipsoidalnych z *Saccharomyces validus* o komórkach wydłużonych, otrzymali hybryda o komórkach pośredniego kształtu. Ze skrzyżowania *Saccharomyces Bayanus* (komórki wydłużone) z *Saccharomyces cerevisiae* (komórki okrągłe) uzyskali mieszańca o komórkach wydłużonych, co wskazuje na dominowanie typu pierwszego. Kształt kolonii hybrydów w rodzaju *Saccharomyces* jest najczęściej pośredni lub w pewnym stopniu zbliżony do kształtu jednej z form rodzicielskich (o ile te różnią się pod tym względem). Czasem jednak zdarzają się odchylenia od tej reguły. Krzyżując natomiast duńskie drożdże piekarniane z *Saccharomyces cerevisiae R II* (obie rasy o koloniach gładkich z nieznacznym prążkowaniem koncentrycznym i promienistym) otrzymali krzyżówki o silnie chropowatej powierzchni kolonii.

Należy podkreślić, że kultury haploidalne tworzą kolonie o małych rozmiarach i chropowatej powierzchni, kultury diploidalne mają natomiast kolonie gładkie i o większych rozmiarach.

Własności enzymatyczne w pierwszym pokoleniu mieszańców są zawsze dziedziczone jako cecha dominująca. Na przykład w zakresie fermentowania sacharozy, krzyżując *Saccharomyces validus* (+) z duńskimi drożdżami piekarnianymi (—) otrzymano mieszańca fermentującego ten cukier. To samo stwierdzono w zakresie fermentowania rafinozy, maltozy, melibiozy i innych (Winge and Laustsen 1939, Kosikow 1947). Badania Kosikowa wykazały, że mieszańce w F_1, podczas rozmnażania wegetatywnego zachowują trwale odziedziczone cechy. W drugim pokoleniu następuje rozszczepienie; część kultur dziedziczy własności jednego z rodziców, a część zajmuje miejsce pośrednie.

Cechy niektórych spośród uzyskanych mieszańców pozwoliły na zastosowanie ich w przemyśle. Tak na przykład okazało się, że drugie pokolenie mieszańców otrzymanych przez Kosikowa (1947) ze skrzyżowania *Saccharomyces ellipsoideus* z *Saccharomyces globosus* oraz *Saccharomyces carlsbergensis* z *Saccharomyces globosus* dobrze fermentują wszystkie cukry proste oraz maltozę, a nie fermentują sacharozy.

Stosując otrzymane krzyżówki w przemyśle zaczęto produkować w Związku Radzieckim słodkie piwo, opierając proces technologiczny na fakcie, że sacharoza dodana do brzeczki nie była fermentowana przez użyte drożdże.

Szereg krzyżówek Wingego stosuje się w przemyśle duńskim, np. skrzyżowanie *Saccharomyces validus* z duńskimi drożdżami piekarnianymi dało mieszańca przewyższającego produktywnością rodziców, fermentującego o 8,3% cukru więcej, oraz gromadzącego 8,6% więcej biomasy.

BADANIA WŁASNE

Niniejsza praca miała na celu uzyskanie przez hybrydyzację mieszańców drożdży piekarnianych, gorzelniczych i winiarskich, które by posiadały cechy bardziej korzystne dla danej gałęzi produkcji niż rasy dotychczas stosowane.

W przypadku drożdży piekarnianych zwracano głównie uwagę na uzyskanie większej wydajności biomasy oraz lepszej siły podnoszenia ciasta. Dla drożdży gorzelniczych i winiarskich miarą lepszej użyteczności mieszańca były szybkość i stopień odfermentowania cukru, własności organoleptyczne oraz dla winiarskich — odporność na SO_2.

Przedstawiona praca jest wstępem do rozpoczęcia badań nad hybrydyzacją drożdży dla celów przemysłowych. Ze względu na to, że praca nad krzyżowaniem drożdży jest długotrwała i wymaga wielu trudnych manipulacji powtarzanych wielokrotnie, dotychczasowe wyniki podaje się do wiadomości w formie doniesienia. Autor zdaje sobie sprawę, że do krzyżowania należy stosować szczepy genetycznie scharakteryzowane, homozygotyczne pod względem żądanych cech. Jednak w pracy niniejszej, ze względu na konieczność dostarczenia przemysłowi możliwie szybko bardziej wydajnych kultur, oparto się tymczasowo na doświadczeniach przypadkowych.

METODYKA BADAŃ

Opierając się na pracach Wingego (1935) i Kosikowa (1952) opracowano własną, nieco zmienioną metodykę pracy, przystosowaną do miejscowych warunków, a różniącą się od metod Wingego i Kosikowa sposobem rozrywania worków, rozmieszczeniem kropel na szkiełku nakrywkowym oraz rodzajem kamery manipulacyjnej.

Podstawową aparaturą w pracy nad krzyżowaniem drożdży jest mikromanipulator i mikroskop. Mikromanipulator, którym posługiwano się w niniejszej pracy, został wyprodukowany w kraju przez Państwowe Zakłady Optyczne według wzoru mikromanipulatora Peterfiego. Posiada on jednak szereg wad, z których najistotniejszą jest niedostateczna precyzja. Chcąc na przykład uzyskać przesunięcie igły należy wykonać wiele ruchów śrubą, co działa hamująco na rozwój pracy. Na ogół zasadnicze ruchy igły osiągano przy pomocy stolika mikroskopu, ruchy mikromanipulatora stanowiły zaś jedynie uzupełnienie. Igły szklane wyciągano ręcznie w płomieniu palnika formując ostrze grubości około 2,5μ. W pracy posługiwano się zawsze tylko jedną igłą, a nie dwoma, jak Winge i Kosikow.

Z powodu trudności technicznych przy wyrobie kamer szklanych typu Wingego zastosowano kamery z blachy mosiężnej o wymiarach: długość 58 mm, szerokość 25 mm, wysokość 10 mm. Wymiary otworu górnego wynosiły 20×30 mm.

Kamerę przymocowywano przy pomocy parafiny do szkiełka przedmiotowego. Po wprowadzeniu igły do wnętrza kamery oba boczne otwory zatykano watą. Górny otwór kamery przykrywano szkiełkiem nakrywkowym.

Na szkiełku nakrywkowym wysterylizowanym w płomieniu umieszczano sterylnie 4 krople wiszące — po dwie krople z lewej i prawej strony. Krople po lewej stronie stanowiły wodną zawiesinę dwu różnych szczepów drożdży zarodnikujących. Po prawej stronie znalazły się 2 krople brzeczki o gęstości 8° Blg z 1-procentowym dodatkiem żelatyny. Dodatek żelatyny stosowano w tym celu, aby ciepło lampy mikroskopowej nie wysuszało zbyt prędko preparatu.

Po wprowadzeniu igły do wnętrza kamery i zatkaniu jej otworów watą, ostrze igły zanurzano w jednej z kropli zawierającej worki z zarodnikami. Jeśli igła miała niezbyt ostre zakończenie, a lekko zaokrąglone, wówczas przyciągała ona komórki do siebie, dzięki czemu wyciągnięcie dowolnej komórki nie przedstawiało trudności. Wybierano dobrze wykształcony worek, położony na brzegu kropli, i poruszając igłą poziomo po powierzchni szkiełka wyciągano go z kropli. Następnie nagniatano igłą worek, by spowodować jego rozerwanie i uwolnienie zarodników. Był to trudny zabieg i nie wszystkie worki udawało się rozerwać.

W przypadku rozerwania worka „chwytano" dwa uwolnione zarodniki na igłę i przesuwano je po powierzchni szkiełka w kierunku kropli z pożywką. Jeśli igła miała dobre zakończenie, to zarodniki trzymały się mocno ostrza i można je było szybko przenieść na żądane miejsce. Jeżeli jednak igła nie odpowiadała całkowicie wymaganym warunkom, wówczas zarodniki podczas przenoszenia ich odpadały od ostrza i trzeba było często wielokrotnie cofać igłę, aby je ponownie uchwycić. W przypadku, kiedy przecinanie worka a następnie przenoszenie zarodników trwało zbyt długo, krople pożywki wysychały i trzeba było zaczynać pracę od początku, to znaczy od przygotowania nowego szkiełka z kroplami.

Kiedy zarodniki zostały już przyciągnięte do kropli z brzeczką, wówczas jeden z nich pozostawiano w pobliżu kropli a drugi wprowadzano do jej wnętrza. Następnie cofano igłę do pozostawionego przed chwilą zarodnika i przenoszono go do drugiej kropli z pożywką. Po dokonaniu tego wprowadzano igłę do kropli zawierającej spory drugiego szczepu i powtarzano poprzednią procedurę.

Uwolnione zarodniki umieszczano po jednym w każdej kropli, obok poprzednio tam pozostawionych. Zarodniki należało ułożyć w kropli jak najbliżej, najlepiej tak, aby dotykały do siebie. Następnie zdejmowano delikatnie szkiełko nakrywkowe z kamery operacyjnej. Wyjałowioną bibułą usuwano krople z zawiesiną komórek, a zostawiano tylko krople brzeczki z wyizolowanymi zarodnikami. Po dokonaniu tego szkiełko przymocowywano przy pomocy wazeliny do szklanego pierścienia Büchnera i wstawiano do termostatu o temperaturze 28-30°. W tych warunkach spory kiełkowały i kopulowały po upływie mniej więcej 17-20 godzin. Po zajściu procesu kopulacji należało odczekać aż mieszaniec utworzy już taką liczbę komórek, że staną się one widoczne gołym okiem. Wówczas przenoszono je przy pomocy pętli do probówki z brzeczką, skąd po ich rozmnożeniu wysiewano na szalkę Petriego, a następnie na skos agarowy. W ten sposób uzyskiwano czystą kulturę mieszańca, którego własności badano przez poddanie fermentacji.

Badania zdolności fermentacyjnej mieszańców wykonano w skali laboratoryjnej, ćwierćtechnicznej i fabrycznej.

Produkcja drożdży piekarnianych dzieli się na stadia, czyli generacje. Jako pożywkę stosuje się roztwór melasu, doprowadzany stopniowo w czasie trwania fermentacji. Gęstość melasu oznaczona w stopniach Ballinga zależna jest od generacji. Prócz melasu dodaje się również do fermentującego zacieru sole w postaci fosforanu amonu i siarczanu amonu (w fabryce fosforan amonu zastępuje się superfosfatem).

Do fermentacji w skali laboratoryjnej używano szklanych aparatów Kluyvera o pojemności 1 litra, stosując przewietrzanie za pomocą próżniowych pomp wodnych.

Schemat fermentacji w warunkach laboratoryjnych był następujący:

I stadium — drożdże z rysy przeniesione do kolbki z brzeczką o gęstości 10° Bllg na 24 godzin w temperaturze 30°.

Duży aparat Lindnera — 100 ml melasu o 13° Bllg. Słabe nawietrzanie w płuczce przez 16 godzin.

Generacja A — 300 ml melasu o 12° Bllg. Słabe nawietrzanie w aparacie Kluyvera w ciągu 12 godzin.

Generacja B — 600 ml melasu o 9° Bllg. Nawietrzanie w aparacie Kluyvera w ciągu 9 godzin. *pH* nastawiano na około 5,0.

Dodatek soli do generacji A — 0,5 g fosforanu amonu i 1,0 g siarczanu amonu.

Dodatek soli do generacji B — 1,0 g fosforanu amonu i 2,5 g siarczanu amonu.

Drożdże z generacji B odsączano na sączkach Schotta G 4 i brano z niej 7 g masy jako wysiew do generacji I. Wysiew drożdży do generacji II i III również wynosił po 7 g.

Schemat hodowli drożdży generacji I, II i III
Схема выращивания дрожжей I, II, III генерации

Godzina Время (в часах)	Dopływ melasu w % Приток мелассы в %			Godzina Время (в часах)	Dopływ melasu w % Приток мелассы в %		
	I	II	III		I	II	III
0	50,0	13,0	20.0	7	—	13,0	13,0
1	12,5	—	—	8	—	13,0	13,0
2	12,5	6,0	5,0	9	—	13,0	10,0
3	12,5	6,0	5,0	10	—	4,0	7,0
4	12,5	6,0	7,0	11	—	—	—
5	—	13,0	10,0	12	—	—	—
6	—	13,0	10,0				

Do przeprowadzenia prób użyto następujących surowców:

dla generacji I: 800 ml melasu o 6° Bllg, 2 g siarczanu amonu i 1 g fosforanu amonu;

dla generacji II: 800 ml melasu 3° Bllg, 1 g siarczanu amonu, 0,4 g fosforanu amonu;

dla generacji III: 800 ml melasu 2° Bllg, 1 g siarczanu amonu i 0,4 g fosforanu amonu.

Odczyn melasu we wszystkich generacjach wynosił 4,5-5 g. Próby przeprowadzano w temperaturze 30°.

Stadium I prowadzono w ciągu 10 godzin, a II i III po 12 godzin.

Ponieważ we wszystkich generacjach końcowe godziny były przeznaczone na dojrzewanie komórek drożdżowych, a nie na ich dalsze rozmnażanie, dlatego też dopływy melasu rozkładano w I generacji na pierwsze 4 godziny fermentacji, a w II i III generacji na 10 godzin.

W skali ćwierćtechnicznej prowadzono fermentację w kadziach z blachy żelaznej o pojemności 21 i 50 litrów. Na skalę fabryczną próby wykonywano według instrukcji technologicznej obowiązującej drożdżownię.

Badania mieszańca drożdży gorzelniczych przeprowadzano tylko w warunkach laboratoryjnych, używając do tego celu kolb Erlenmeyera o pojemności 750 ml. Do prób użyto 60 g melasu z dodatkiem 0,1785 g siarczanu amonu, 0, 95 g kwaśnego fosforanu sodowego, 0,014 g chlorku magnezu oraz 5 g drożdży prasowanych. Kolby Erlenmayera zamykano korkami zaopatrzonymi w rurki fermentacyjne napełnione stężonym kwasem siarkowym, ważono i umieszczano w temperaturze 28-30°. Ważenie powtarzano co 24 godziny. Fermentację uważano za skończoną, gdy ubytek na wadze wynosił nie więcej niż 0,2-0,3 g, co trwało do 3-4 dni. Po zakończonej fermentacji przeprowadzano dwukrotną destylację. Moc destylatu oznaczano metodą piknometryczną.

PRZEBIEG PRACY

Wykonano krzyżowanie drożdży piekarnianych szczepów: *As* i *Luboń*. Drożdże doprowadzano do stanu zarodnikowania. Najczęściej spotykano w czasie badań worki z dwoma zarodnikami, rzadziej z czterema zarodnikami. W toku pracy zaobserwowano, że wyizolowane zarodniki umieszczane w kroplach parami nie zachowywały się jednakowo względem siebie. Niektóre z nich można było stosunkowo łatwo ułożyć blisko siebie przy pomocy igły. Wysunięcie igły z kropli nie wpływało na zmianę położenia zarodników względem siebie. Przypuszczalnie zachodziło tu zjawisko heterotalizmu opisywane szczegółowo przez Lindengrena (1949). Pomiędzy danymi zarodnikami posiadającymi znaki przeciwne + i — działały siły wzajemnego przyciągania. W innych wypadkach natrafiono na zarodniki tych samych znaków + i + albo — i —, które, mimo że zostały ułożone obok siebie, przy wysuwaniu igły z kropli natychmiast odskakiwały od siebie. Należy zaznaczyć, że nie można było z góry przewidzieć zachowania się zarodników względem siebie na podstawie ich wyglądu zewnętrznego.

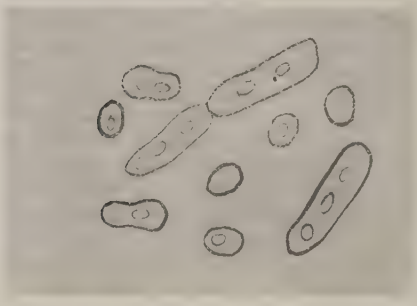
Obserwacje dokonane w kamerze Büchnera po upływie 18-20 godzin w temperaturze 28° pozwoliły stwierdzić obecność znacznej ilości zarodników niezdolnych do rozmnażania nie tylko przez kopulację, lecz także przez pączkowanie. Takie spory stopniowo kurczyły się i zamierały. Zarodniki zdolne do rozmnażania się pęczniały natomiast już po kilku godzinach, powiększały się a następnie pączkowały.

Krzyżując drożdże piekarniane rasy *As* z rasą *Luboń* udało się uzyskać 2 mieszańce. Pierwszy mieszaniec nazwano literą *B*, drugi *G*.

1. Mieszaniec *B*.

Wyizolowane spory umieszczono obok siebie w kropli brzeczki o godzinie 15. Następnego dnia o godzinie 7,45 zaobserwowano kopulację. Po 48 godzinach ilość komórek była już tak duża, że tworzyła w kropli widoczny biały osad. Wówczas przy pomocy pętli przeniesiono drożdże

do probówki z brzeczką, gdzie nastąpiło dalsze ich rozmnażanie. Komórki te miały kształt bardzo nieregularny. Znaczna ich część wytwarzała silnie wydłużone wyrostki (rys. 2).



Rys. 2. Komórki mieszańca *B*

Po przeprowadzeniu kilku cykli fermentacyjnych procent komórek z wyrostkami znacznie się zmniejszył (na pożywce płynnej). Na pożywce stałej wszystkie prawie komórki posiadały kształty regularne. W ciągu następnych fermentacji wszystkie komórki zatraciły zdolność tworzenia wyrostków, bez względu na rodzaj pożywki.

Badanie mieszańca w skali laboratoryjnej obejmowało 6 cykli fermentacyjnych. Średnie wyniki tych prób przedstawia tabela Ia.

W skali ćwierćtechnicznej przeprowadzono trzy cykle fermentacyjne. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli Ib.

Tabela I

Charakterystyka mieszańca *B* — Характеристика гибрида *B*

Generacja Генерация	Wydajność Выход дрожжей %	Sucha substancja Сухое вещество %	Azot w suchej substancji Азот в сухом веществе %	Białko w suchej substancji Белок в сухом веществе %	Siła pędna w min. Подъемная сила мин.
a) badania w skali laboratoryjnej — в лабораторных условиях					
DL* A+B	9,4	22,40	9,64	58,0	—
I	12,2	22,00	9,81	58,0	—
II	20,6	23,20	4,31	52,0	—
III	39,0	24,10	8,30	48,0	68+25
b) badania w skali ćwierćtechnicznej — в четвертьпроизводственных условиях					
I	13,3	21,00	10,00	57,00	—
II	36,6	22,00	8,6	41,62	—
III	40,0	23,20	7,3	37,04	70+20

* Duży aparat Lindnera.

Wydajność obliczono ze stosunku ilości otrzymanych drożdży do zużytego cukru. Ilość drożdży przeliczano w stosunku do suchej substancji = 100% (D_{100}). Siła pędna jest to czas podnoszenia ciasta; bada się ją tylko dla III generacji.

Tabela II

Wydajność drożdży mieszańca *B* (w drożdżowni X) — Выход дрожжей гибрида *B* (на дрожжевом заводе X)

Generacja Генерация	Melas мелясса Ilość kg Количество кг	Melas мелясса % cukru % сахара	Ilość cukru kg Количество сахара кг	Ilość drożdży z pras netto kg Выход прессованных дрожжей кг	Ilość drożdży D_{100} kg Выход дрожжей D_{100} кг	Sucha substancja drożdży prasowanych % Сухое вещество прессованных дрожжей %	Wydajność % Выход дрожжей %	Azot w suchej substancji % Азот в сухом веществе %	Białko w suchej substancji % Белок в сухом веществе %	P_2O_5 w suchej substancji % Фосфор в сухом веществе %
ML, DL*										
A+B	1800	49,59	892	220	68,23	26,47	7,64	9,95	62,30	7,50
I	5300	50,12	2656	1514	401,22	26,53	12,63	3,42	52,60	5,66
II	4200	50,00	2100	2859	828,54	28,98	39,45	6,74	42,03	3,96
III	4500	50,00	2250	3216	985,70	30,65	43,80	6,23	38,93	3,11
III	4500	50,00	2250	3448	1082,67	31,40	48,11	5,67	35,45	3,38
III	4500	49,64	2234	3273	1008,41	30,81	45,13	5,61	35,03	2,61
III	4500	49,64	2234	2991	881,45	29,47	39,45	5,84	36,49	—
II	4200	49,68	2087	3096	883,91	28,55	42,35	6,67	41,62	3,63
III	4500	50,68	2281	3445	984,24	28,57	43,14	5,36	42,12	—
III	4500	50,44	2270	2886	833,19	28,87	36,70	5,98	37,04	—
III	4500	49,04	2207	3491	1098,72	31,41	49,78	5,28	41,52	3,10
III	4500	50,30	2264	3418	909,53	26,60	40,17	6,00	38,62	—
II	4200	50,40	2117	2623	701,91	26,75	33,18	7,09	44,28	4,17
III	4500	49,32	2219	3044	865,71	28,43	40,89	5,74	35,82	3,14
III	4500	49,96	2148	3092	935,33	30,24	43,54	5,66	35,38	
III	4000	48,60	1944	2527	700,23	27,70	35,79	6,00	37,39	3,53
III	4500	49,00	2205	3273	985,17	30,10	44,68	5,38	33,65	

* ML mały aparat Lindnera, DL — duży aparat Lindnera.

Ogółem zużyto cukru 36 358 kg. Ogólna ilość otrzymanych drożdży z pras po przeliczeniu na suchą substancję 100% wyniosła 13 954,15 kg.

Wydajność z I cyklu w przeliczeniu na cukier i suchą substancję D_{100} wyniosła 37,36%. Wydajność z II cyklu produkcyjnego — 39,65%. Siła pędna mieszańca wahała się w następujących granicach: I pęd — 66-85 min., II pęd — 18-28 min. Trwałość w temperaturze 35° wyniosła 120-168 godzin.

Próby na skalę fabryczną przeprowadzono w dwóch drożdżowniach. W drożdżowni X prowadzono fermentację metodą zwrotnej separacji, polegającej na zawracaniu części mleczka z wirówek do kadzi fermentacyjnej, podczas gdy reszta kierowana była na prasy. Przeprowadzano dwa cykle produkcyjne: I — dla którego punktem wyjściowym była czysta kultura, II — regeneracja 1 kg drożdży w małym aparacie Lindnera z generacji B poprzedniego cyklu (tabela II).

W drożdżowni Y regenerowano 10 kg drożdży generacji B przysłanych z drożdżowni X, zaczynając cykl od generacji A i stosując klasyczną metodę fermentacji (tabela III).

Tabela III

Wydajność drożdży mieszańca *B* (w drożdżowni Y)

Выход дрожжей гибрида *B* (на дрожжевом заводе Y)

Generacja Генерация	Melas Меласса: Ilość kg Количество кг	Melas Меласса: % cukru % сахара	Ilość cukru w kg Количество сахара кг	Drożdże z pras netto kg Дрожжи прессованные кг	Sucha substancja drożdży prasowanych % Сухое вещество прессованных дрожжей %	Ilość drożdży D_{100} kg Выход дрожжей D_{100} кг	Wydajność % Выход дрожжей на сахар и сухое вещество %
I	2800	46,0	1288,0	612	30,4	186,04	14,44
II	2400	47,2	1132,8	1761	29,1	512,45	45,26
III	2000	44,8	896,0	1328	30,7	407,69	45,42
III	2400	46,0	1104,0	1619	29,8	482,46	43,70
II	2400	45,2	1084,8	1638	30,4	497,95	45,90
III	2400	45,6	1094,4	1610	30,1	484,61	44,30
III	2000	45,2	904,0	1398	28,5	398,73	44,10
III	2400	46,4	1113,6	1606	29,6	475,37	42,70
III	2000	46,8	936,0	1381	29,3	404,63	43,20
III	2600	46,8	1216,8	1679	29,3	491,94	40,40
III	2400	46,4	1113,6	1659	29,4	487,74	43,80

Ogółem zużyto cukru 11 884.0 kg. Ilość otrzymanych drożdży z pras po przeliczeniu na suchą substancję 100% wyniosła 4 829,61 kg. Wydajność z cyklu w przeliczeniu na cukier i suchą substancję D_{100} = 40,63%.

2. Mieszaniec *G*.

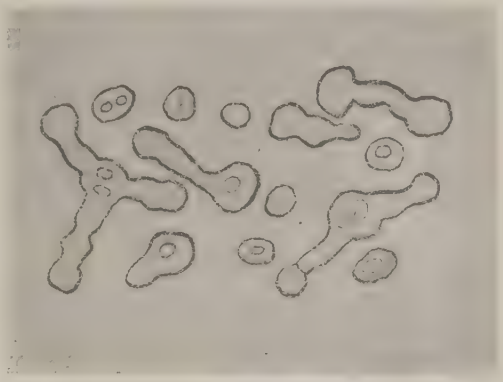
Spory umieszczano w kropli z brzeczką o godzinie 14,45. Następnego dnia rano, o godzinie 8,30 zaobserwowano kopulację. Po 48 godzinach mieszaniec rozmnożył się na tyle, że można go było przenieść przy pomocy pętli do probówki z brzeczką, a następnie wysiać na pożywkę stałą.

Komórki mieszańca miały jednakową wielkość i kształt lekko owalny. Tylko nieliczne komórki były większych rozmiarów, silnie wydłużone, lecz z czasem zanikły (rys. 3).

W celu zbadania wartości produkcyjnej mieszańca przeprowadzono 4 cykle fermentacyjne w skali laboratoryjnej oraz 3 cykle w skali ćwierćtechnicznej. Średnie wyniki z tych prób przedstawiono w tabeli IV.

W skali fabrycznej postąpiono podobnie jak z mieszańcem *B* — w drożdżowni X wyprowadzono czystą kulturę i przeprowadzono cały cykl produkcyjny metodą zwrotnej separacji (tabela V).

Z generacji B tego cyklu wysłano 10 kg drożdży do drożdżowni Y, gdzie regenerowano je, począwszy od generacji A. W drożdżowni Y próby prowadzono według metody klasycznej (tabela VI).



Rys. 3. Komórki mieszańca *G*

Tabela IV

Charakterystyka mieszańca *G* — Характеристика гибрида *G*

Generacja Генерация	Wydajność Выход дрожжей %	Sucha substancja Сухое вещество %	Azot w suchej substancji Азот в сухом веществе %	Białko w suchej substancji Белок в сухом веществе %	Siła pędna w min. Подъемная сила мин.
a) w skali laboratoryjnej — в лабораторных условиях					
DL A+B	12,2	22,0	10,54	67,4	—
I	17,0	23,5	9,36	57,0	—
II	22,7	24,0	6,66	39,0	—
III	39,4	26,0	6,15	39,0	85+22
b) w skali ćwierćtechnicznej — в четвертьпроизводственных условиях					
I	17.2	24,2	10,00	59,0	—
II	33,4	24,0	8,12	45,7	—
III	41,6	25,8	7,05	43,7	87+20

Tabela V

Wydajność drożdży mieszańca G (w drożdżowni X) — Выход дрожжей гибрида G (на дрожжевом заводе X)

Generacja Генерация	Melas Меласса: Ilość kg Количество кг	Melas Меласса: % cukru % сахара	Ilość cukru kg Количество сахара кг	Ilość drożdży z pras netto kg Выход прессованных дрожжей кг	Ilość drożdży D_{100} kg Выход дрожжей D_{100} кг	Sucha substancja drożdży prasowanych % Сухое вещество прессованных дрожжей %	Wydajność % Выход дрожжей %	Azot w suchej substancji % Азот в сухом веществе %	Białko w suchej substancji % Белок в сухом веществе %	P_2O_5 w suchej substancji % Фосфор в сухом веществе %
ML, DL	560	50,30	281,7	61	14,51	23,80	5,15	10,13	63,35	6,46
A+B+I	7000	51,48	3605,0	1505	376,70	25,03	10,44	10,03	62,65	5,92
II	4200	50,36	2116,8	2274	650,14	28,59	30,71	7,84	49,04	4,09
III	4500	48,68	2191,5	2798	862,62	30,83	39,37	5,85	36,54	—
III	4000	51,76	2068,0	2573	796,09	30,94	38,47	6,31	38,88	—
III	4000	50,50	2020,0	2793	871,13	31,19	43,12	5,88	36,68	—
II	4200	50,48	2121,0	2505	696,89	27,82	32,85	7,52	46,96	4,52
III	4500	50,96	2290,5	2912	909,41	31,23	39,71	5,80	36,22	—
III	4000	51,52	2060,0	2572	844,64	32,84	41,00	5,59	34,80	—
III	4500	51,64	2322,0	2840	884,94	31,16	38,11	5,72	35,73	—
III	4500	51,24	2304,0	3316	987,84	29,79	42,89	5,56	34,74	—
II	4200	51,56	2163,0	2531	777,27	30,71	35,94	7,29	45,59	—
III	4000	51,08	2044,0	3052	959,85	31,45	42,07	5,49	34,24	—
III	4500	51,42	2313,0	3201	955,50	29,85	41,31	6,17	38,53	3,34
III	4000	50,07	2004,0	2871	866,02	30,27	43,21	5,68	35,43	—
III	4500	49,97	2250,0	3322	946,11	28,48	42,05	5,54	35,51	—

Ogółem zużyto cukru 34 154,5 kg. W przeliczeniu na suchą substancję 100% uzyskano drożdży 12 399,76 kg. Wydajność z cyklu w przeliczeniu na cukier i suchą substancję D_{100} — 36,30. Siła pędna mieszańca wahała się w następujących granicach: I pęd — 93-110 min. II pęd — 20-26 minut. Trwałość 114-148 godzin.

Tabela VI

Wydajność drożdży mieszańca *G* (w drożdżowni Y)

Выход дрожжей гибрида *G* (на дрожжевом заводе Y)

Generacja Генерация	Melas Меласса Ilość kg Количество кг	Melas Меласса % cukru % сахара	Ilość cukru kg Количество сахара кг	Drożdże z pras netto kg Дрожжи прессованные кг	Sucha substancja drożdży prasowanych % Сухое вещество прессованных дрожжей %	Ilość drożdży D_{100} kg Выход дрожжей D_{100} кг	Wydajność % Выход дрожжей %
I	2800	46,0	1288,0	620	25,6	158,72	12,32
II	2400	46,8	1123,2	1517	29,4	445,99	39,71
III	2000	46,8	936,0	1213	29,3	355,40	37,97
III	2400	47,4	1137,6	1565	28,9	452,28	39,77
II	2400	48,0	1152.0	1395	28,6	398,97	34,63
III	2400	46,8	1123,2	1228	29,3	359,80	32,03
III	2000	46,0	920,0	1273	29,9	380,62	41,37
III	2400	46,4	1113,6	1544	29,3	452,39	40,64
III	2000	45,6	912,0	1255	30,2	379,01	41,55
III	2400	46,0	1104,0	1484	29,9	443,71	40,19
III	2400	46,0	1104,0	1311	29,3	384,12	34,79
III	2400	45,2	1084,8	1508	30,2	455,41	41,97

Ogółem zużyto cukru 12 994,4 kg.
Uzyskano drożdży D_{100} — 4666,42 kg.
Wydajność z cyklu — 35,91%.

Przeprowadzone próby fabryczne wykazały, że mieszaniec *G* nie przedstawia dla celów przemysłowych większego znaczenia niż szczepy rodzicielskie. Hybryd *B* przewyższa natomiast wydajnością formy wyjściowe, a mianowicie średnia wydajność mieszańca z przeprowadzonych 3 cykli produkcyjnych była większa od średniej wydajności rocznej szczepu *As* o 3,3%, a od szczepu *Luboń* o 5,5%. Średnia roczna wydajność szczepu *As* w 1953 roku wynosiła 35,91%, a szczepu *Luboń* 33,71%. Jednocześnie trwałość i siła pędna mieszańca odpowiadały normom.

Biorąc pod uwagę powyższe wyniki, mieszaniec *B* został wprowadzony do przemysłu i jest stosowany jako nowy szczep drożdży piekarnianych.

3. Mieszaniec S_1

Mieszaniec S_1 powstał ze skrzyżowania drożdży gorzelniczych rasy *Ja* ze szczepem *0-11*. Mieszaniec ten został wypróbowany w skali laboratoryjnej, przy czym jednocześnie nastawiano fermentację przy użyciu szczepów rodzicielskich. Wyniki zestawiono w tabeli VII.

Wobec identycznych prawie wyników jakie otrzymano badając mieszańca S_1 i jego formy rodzicielskie, prób w skali fabrycznej nie prowadzono.

Tabela VII

Charakterystyka mieszańca S_1 — Характеристика гибрида S_1

Szczep Штамм	Ubytek na wadze po 24 godz. Потеря веса после 24 часов	Ubytek na wadze po 48 godz. Потеря веса после 48 часов	Moc destylatu % Содержание спирта	Ilość 100% alkoholu na 100 ml melasu Количество 100% спирта на 100 мл мелассы
S_1	14,10 g	0,35 g	9,55	31,6
0-11	14,00 g	0,55 g	9,55	31,6
Ja	13,95 g	0,58 g	9,55	31,6

CECHY FIZJOLOGICZNE MIESZAŃCÓW I SZCZEPÓW RODZICIELSKICH

Badanie cech fizjologicznych mieszańców i szczepów rodzicielskich drożdży (metodą Loddera i Kregera 1952), obejmowały zdolność drożdży do fermentowania niektórych cukrów, do asymilacji azotanu potasu oraz do wykorzystania alkoholu etylowego jako źródła węgla.

Fermentację cukrów przeprowadzono w probówkach Durhama napełnionych 2-procentowym roztworem różnych cukrów w wodzie drożdżowej. Zdolność drożdży do fermentowania cukrów stwierdzano po 2-7 dniach. Otrzymane wyniki przedstawiono w poniższym zestawieniu:

Zdolność do fermentowania cukrów

Cukier	*B*	*G*	*Luboń*	*As*	S_1	*Ja*	*0-11*
Galaktoza	—	—	+	+	+	+	+
d-glikoza	+	+	+	+	+	+	+
Laktoza	—	—	—	—	—	—	—
d-maltoza	+	+	+	+	+	+	+
Sacharoza	+	+	+	+	+	+	+

Zdolność do asymilacji KNO_3 oznaczano na płytkach Petriego przy użyciu syntetycznej pożywki agarowej (glikoza — 2%, KH_2PO_4 — 0,1%, $MgSO_4 . 7H_2O$ — 0,05%, agar — 2%). Wszystkie badane szczepy drożdży, zarówno rodzicielskie, jak i mieszańce, korzystały z tej formy azotu. Jako źródło węgla mogły wykorzystywać alkohol etylowy.

*

* *

Uzyskane wyniki można zreasumować następująco:

a) Kopulacja między zarodnikami szczepów drożdży piekarnianych *As* i *Luboń* oraz szczepów drożdży gorzelniczych *Ja* i *0-11* zachodziła tylko w nielicznych przypadkach.

b) Do skrzyżowania najlepiej jest wybierać szczepy o wybitnie różnych cechach. Wówczas mieszaniec, dziedzicząc własności obojga rodziców, będzie bardziej wartościowym szczepem.

Ponieważ dysponowaliśmy tylko podobnymi szczepami drożdży piekarnianych, nasze mieszańce nie mogły wykazać się specjalną oryginalnością.

Spośród tych mieszańców mieszaniec *B* wykazał różnice morfologiczne (tworzenie wypustek komórkowych we wczesnym okresie po kopulacji), a także posiadał większą wydajność aniżeli szczepy rodzicielskie.

W odróżnieniu od ras wyjściowych mieszańce *B* i *G* nie fermentowały galaktozy.

LITERATURA

Badian M. J., 1937: Sur la cytologie des levures. *Bull. Int. l'Acad. Polonaise des Sciences et de Lettres.* Ser. *B I*, **1**.

Kosikow K. W., 1947: Gibridy mieżdu *Sacch. ellipsoideus x Sacch. globosus. Mikrobiologia,* **16**: 473-476.

Kosikow K. W., 1948a: Sporoobrazowanije i żizniesposobnost' spor u *Sacch. ellips., Sacch. globosus* i u gibridow mieżdu etimi widami. *Trudy Inst. Gienietiki A. N. SSSR.* **15**: 153-162.

Kosikow K. W., 1948b: Gienieticzeskij analiz gamietogienieza u drożżej roda *Saccharomyces. DAN SSSR,* **61**, **4**: 709-712.

Kosikow K. W., 1951: Mietody gibridizacji i naprawliennoj izmiencziwosti w sielekcji drożżewych kultur. *Mikrobiologia,* **20**: 365-377.

Kosikow K. W., 1952: Nowyj mietod wydielanija otdielnych klietok mikroorganizmow. *Mikrobiologia,* **21**: 449-452.

Lindegren C. C., 1949: The yeast cell, its genetics and cytology. St. Louis.

Lutman B. F., 1929: Microbiology.

Lietz K., 1952: Beitrag zur Hefecytologie. *Brauwissenschaft,* **6**.

Lodder J., 1952: The yeast. Amsterdam.

Shih-Yi-Chen M., 1950: Sur une nouvelle technique de croisment des levures. *Compt. Rend. hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences.* 230. **21**: 1897-1903.

Winge O., 1935: On haplophase and diplophase in some *Saccharomyces. Compt. Rend. Lab. Carlsb. Ser. Physiol.* **21**; **4**: 77-112.

Winge O. and Laustsen O., 1937: On two types spore germination and on genetic segregations in *Saccharomyces*, demonstrated through-single-spore cultures. *Ibidem.* **22**, **6**: 99.

Winge O. and Laustsen O., 1939: On 14 new yeast types produced by hybridization. *Ibidem,* 22, 21.

Winge O. and Roberts C., 1948: Inheritance of enzymatic characters in yeast and the phenomenon of long term adaptation. *Ibidem.* 24, **22**: 35.

Я. Гужиньска

ПРОБА ОБРАЗОВАНИЯ НОВЫХ РАСС ДРОЖЖЕЙ ПУТЕМ ИХ СКРЕЩИВАНИЯ

Резюме

В результате двухлетней работы над скрещиванием дрожжей получено 3 гибрида. Два из них *B* и *G* образовались при скрещивании хлебопекарских дрожжей *As* и *Luboń* и третий S_1—гибрид спиртовых дрожжей *Ja* и *0-11*.

Исследование производственных свойств гибридов *B* и *G* проведено: 10 в лабораторных условиях, 6 в четвертьпроизводственных условиях и 5 на дрожжевых заводах.

Гибрид S_1 исследовано только в лабораторных условиях.

На основании проведенных опытов автор пришел к заключению, что гибриды *G* и S_1 не представляют большего значения для дрожжевого производства.

Гибрид *B* оказался более продуктивным, чем скрещиваемые рассы; выход дрожжей-гибрида *B* был на 3,3% больше чем *As* и 5,5% чем *Luboń*.

SPIS TREŚCI — СОДЕРЖАНИЕ — CONTENTS

1. J. Paluch i K. Kluczycki: Prof. dr. inż. Adolf Joszt. 103
2. J. Baranowska and D. Shugar: The role of proteins in, and the question of localization of, the Gram reaction.
Rola białek i zagadnienie lokalizacji reakcji przy barwieniu metodą Grama. 107
3. J. Brill i S. Gołębiowski: Szczepy *Brucella suis* wydzielone ze świń po raz pierwszy w Polsce.
The first isolation of *Brucella suis* from pigs in Poland. 115
4. J. Kwapiński: Budowa chemiczna i antygenowa maczugowców. . . 133
5. I. Michalska: Flora grzybowa i bakteryjna jako czynnik niszczący wełnę owczą.
Fungi and bacteria as a factor in decaying of wool-fibers. 171
6. J. Górzyńska: Poszukiwanie nowych ras drożdży na drodze hybrydyzacji.
Проба образования новых расс дрожжей путем их скрещивания. . . 189

PRZEPISY AUTORSKIE

Jako materiał publikacyjny mogą być nadsyłane rozprawy i komunikaty dotyczące prac oryginalnych z dziedziny mikrobiologii ogólnej, rolniczej i przemysłowej nigdzie dotychczas nie publikowane, a referowane uprzednio na posiedzeniu Oddziału Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów lub innego towarzystwa naukowego. Czasopismo zamieszcza również referaty przeglądowe.

Jednostronne maszynopisy o podwójnych odstępach, z marginesem 4 cm należy przesyłać w 2 egz. na ręce sekretarza: Redakcja „*Acta Microbiologica Polonica*", Wrocław, ul. Siemieńskiego 14/8.

Do prac pisanych po polsku należy dołączyć streszczenie rosyjskie, angielskie, francuskie lub niemieckie. Streszczenia powinny zawierać zasadnicze konkluzje pracy i nie powinny przekraczać 15% tekstu. Prace w obcym języku (rosyjski, angielski, francuski lub niemiecki) mogą być nadsyłane po uprzednim porozumieniu się z redakcją; należy do nich dołączyć streszczenie polskie. Każda praca powinna być zaopatrzona w tytuł w języku publikacji oraz streszczenia, nazwisko i inicjały autora (ów), nazwę i adres zakładu, w którym wykonano pracę.

Pożądany jest następujący układ prac: a) krótki wstęp, b) metody badania, c) wyniki, d) dyskusja i wnioski, e) krótkie streszczenie w języku polskim — nie więcej niż 3% tekstu, f) piśmiennictwo, g) streszczenie obcojęzyczne.

Prace należy ujmować treściwie, wstęp powinien zawierać tylko dane bezpośrednio odnoszące się do opracowanego tematu; metody należy opisać krótko: tam gdzie to możliwe powoływać się na oryginalne opisy metod.

Wyniki mogą być ilustrowane tablicami i wykresami, należy jednak unikać tablic i wykresów dla przedstawienia tych samych danych. Wykresy i tablice powinny być możliwie przejrzyste i nieskomplikowane i ilustrować zasadnicze, istotne wyniki. Rysunki i wykresy można dostarczać w czytelnych szkicach ołówkowych na brystolu, każdy na oddzielnej kartce, zaopatrzonej na odwrocie w wypisane ołówkiem: tytuł pracy, nazwisko autora oraz numer rysunku lub wykresu. Objaśnienia do rysunków i wykresów należy dołączyć na osobnej kartce z wyraźnym zaznaczeniem numeru rysunku (wykresu). W objaśnieniach należy podawać skalę lub wielokrotność powiększenia. Fotografie powinny być kontrastowe, na matowym papierze. Ilość tablic i rysunków musi być ograniczona do minimum.

W maszynopisie należy zaznaczyć miejsce, w którym ma być umieszczony rysunek (wykres, fotografia).

Przy powoływaniu się na piśmiennictwo należy podać nazwiska autorów i rok publikacji, np. Prażmowski (1879) lub (Prażmowski 1879). Jeżeli praca cytuje więcej niż jedną publikację danego autora z tego samego roku, należy to uwidocznić dodając małe litery (np. 1887 a, 1887 b itd.).

Wykaz cytowanych prac (piśmiennictwo) powinien być sporządzony w układzie alfabetycznym i powinien zawierać następujące elementy: nazwisko i inicjały autora (ów), kropka, rok, kropka, tytuł pracy, nazwa czasopisma w przyjętych skrótach, tom (ewentualnie zeszyt), stronica czasopisma; w wypadku cytowania książki: nazwisko i inicjały autora (ów), rok wydania, tytuł książki, wydanie, miejsce i wydawca, ewentualnie stronica tekstu.

W tekście i tablicach należy stosować przyjęte skróty, np. ml — a nie ccm, g — a nie gr, 100° — a nie 100°C, M — molarny, N — normalny itd.

Przy opisie roztworów należy rozróżnić „%" — g na 100 g roztworu, „% objętościowy" — ml na 100 ml roztworu, „stężenie procentowe" — g na 100 ml rozpuszczalnika.

Nazwy drobnoustrojów należy podawać w brzmieniu łacińskim, przy pierwszym wzmiankowaniu — w pełnym brzmieniu. Dopuszczalne jest również jednoczesne podawanie przyjętych ogólnie nazw polskich. W dalszym tekście nazwy rodzajowe (nie gatunkowe) należy skracać lub podawać tylko nazwy polskie.

Autor otrzymuje 25 odbitek bezpłatnie; o dodatkowe odbitki autor może zwrócić się do redakcji przy składaniu maszynopisu.

Członkowie Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów otrzymują „Acta" bezpłatnie, po przekazaniu dodatkowej składki rocznej w wysokości 70,— zł do Sekcji Mikrobiologii Ogólnej PTM (adres: Redakcja „*Acta Microbiologica Polonica*", Wrocław, ul. Siemieńskiego 14, m. 8).

Cena zł 25,—